



Amélioration des propriétés antibactériennes et anticoagulantes des prothèses vasculaires en polyester par immobilisation et libération contrôlée de principes actifs

Elixène Jean Baptiste

► To cite this version:

Elixène Jean Baptiste. Amélioration des propriétés antibactériennes et anticoagulantes des prothèses vasculaires en polyester par immobilisation et libération contrôlée de principes actifs. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2012. Français. NNT : 2012LIL2S043 . tel-01227285

HAL Id: tel-01227285

<https://theses.hal.science/tel-01227285>

Submitted on 10 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Université de Lille Nord de France
Ecole Doctorale Biologie Santé
UFR de Médecine**

THESE

Pour l'obtention du grade de docteur d'Université
Discipline : Recherche clinique, Innovation technologique, Santé publique
Spécialité : Chirurgie vasculaire

Présenté et soutenu publiquement
Le 20 Juin 2012

Par
Elixène JEAN BAPTISTE

**Amélioration des propriétés antibactériennes et
anticoagulantes des prothèses vasculaires en polyester par
immobilisation et libération contrôlée de principes actifs**

Prof. Stéphane HAULON

Directeur

**Prof. Olivier GOEAU-BRISSONNIÈRE
Prof. Nabil CHAKFÉ**

**Rapporteur
Rapporteur**

**Prof. Réda HASSEN-KHODJA
Dr. Nicolas BLANCHEMAIN
Prof. Patrice WOISEL**

**Examineur
Examineur
Examineur**

Avant-propos

Ce travail résulte d'une collaboration multidisciplinaire impliquant deux unités de recherche : l'unité INSERM U1008 de l'université de Lille II dédiée aux médicaments et aux biomatériaux à libération contrôlée, et l'unité des Matériaux et Transformation (UMET) UMR CNRS 8009 de l'université des Sciences et technologies de Lille I dédiée à la chimie des polymères. Ce travail ne serait pas possible sans une bourse de recherche de la Société de Chirurgie Vasculaire de langue française (SCV), sans l'appui des laboratoires Pérouse Médical, de la Société Cook Médical et des laboratoires Endotis Pharma. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes plus profondes gratitude.

Dédicaces et remerciements

Aux Membres du Jury :

Monsieur le professeur Olivier GOEAU-BRISSENIERE,
Vous faites référence absolue dans le domaine des infections de prothèses vasculaires, soyez assuré que je mesure tout l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail.

Monsieur le professeur Nabil CHAKFE,
Par l'ampleur de vos connaissances vous êtes sous nos cieux une autorité unique dans le domaine des biomatériaux en général et vasculaire en particulier. Merci de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail.

Professeur le professeur Patrice WOISEL,
Chimiste organicien hors pair et scientifique à la rigueur inébranlable, merci d'avoir accepté de siéger dans ce jury. J'espère que mon travail sera à la hauteur de vos attentes.

Monsieur le professeur Réda HASSEN-KHODJA,
Mon maître en chirurgie vasculaire, référence absolue de notre spécialité de chirurgie vasculaire, dont la compétence chirurgicale n'a d'égale que ses qualités humaines, scientifiques et pédagogiques exceptionnelles. Merci de m'avoir inculqué le goût de l'excellence et de m'avoir toujours fait confiance. J'espère que ce travail sera à la hauteur de vos espérances.

Professeur Stéphane HAULON,
Mon directeur de thèse, de m'avoir inspiré ce travail, de l'avoir dirigé avec efficacité et efficacité, d'avoir grandement contribué à ma formation chirurgicale et scientifique, et pour son amitié.

Docteur Nicolas BLANCHEMAIN,
Maître de conférence à l'université de Lille Nord de France
De m'avoir dirigé avec rigueur et dévouement, pour son accessibilité, son amitié et sa disponibilité. J'ai beaucoup appris à son contact. Sans lui, ces travaux tout simplement ne seraient pas.

Je voudrais aussi remercier :

Le professeur Bernard MARTEL de l'UMET 'UMR 8009 CNRS de m'avoir accueilli toujours avec bienveillance et de m'avoir permis de faire de la chimie au sein de son laboratoire. Il a grandement inspiré ces travaux et merci d'avoir toujours revu avec justesse, précision et rigueur scientifiques mes différents manuscrits.

Le docteur Harmut HILDEBRAND,
Directeur émérite de recherche INSERM de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de recherches (INSERM U1008) d'abord comme étudiant en Master II puis comme doctorant.

Le professeur Juergen SIEPMANN directeur de notre laboratoire pour ses enseignements du Mercredi.

Le docteur Feng CHAI dit Cherry pour son encadrement, sa disponibilité et ses enseignements au laboratoire de biologie.

Le docteur Maude JIMENEZ pour ses enseignements sur le traitement plasma froid et pour avoir mis les structures de son laboratoire à ma disposition.

Le Docteur Christel NEUT,
Bactériologiste chevronnée,
Pour ses enseignements, son encadrement, sa patience, sa disponibilité et pour avoir relu avec rigueur mes manuscrits.

Le docteur Malika BALDUYCK,
Pour son aide précieuse dans la mise au point de la chromatographie par gel filtration.

Messieurs Thierry CHASSAT et Anthony MOURRAY de l'institut Pasteur de Lille pour m'avoir accueilli et encadré dans leur laboratoire d'expérimentation animale avec cette gentillesse et cette hospitalité légendaires des gens du Nord de la France.
Qu'ils trouvent ici l'expression de ma plus profonde gratitude.

Mes collègues chirurgiens vasculaires de Nice et de Lille,
Serge Declémy, Aurélien Mousnier et Richard Azzaoui pour leur support.
Merci beaucoup spécialement à toi Serge, sans ta disponibilité et ton sens aigu de l'entraide tout cela ne serait pas possible.

Le Professeur Michel BATT du CHU de Nice pour son soutien et ses encouragements.

L'ensemble des thésards, stagiaires, « post-doc » et assistant ingénieurs de recherches des laboratoires INSERM U1008 et UMET UMR en particulier Imen Kacem, Myriem Gargouri et Mickael MATON pour leur aide inestimable dans la réalisation des manipulations.
Merci Micka, je te dois beaucoup.

Merci aussi à Annie et à Monique pour m'avoir souvent facilité la logistique.

Pour mon fils Noah et pour ma moitié adorée Verena,
Avec amour et affections,
Cela n'aurait aucun sens sans vous.

A ma mère Marie Elia, pour un sens exemplaire du dévouement et d'abnégation.

A ma belle famille, pour leur accueil inconditionnel
Anneliese, Joachim, Amélie et Koen, merci de votre support et d'être toujours là pour
nous.

A mes oncles et tantes et spécialement Tonton Michel sur qui je peux toujours compter.

A Jean-Claude et à Michèle de nous avoir adoptés à Nice et pour votre support moral.

A Marina, à Hugo et à Serge encore le même pour votre amitié .

Glossaire

bNH2-PEG	Polyéthylène glycol bi aminé
CD	cyclodextrine
CFX	Ciprofloxacine
CTR	Acide citrique
Dtex	Masse en gramme pour 10000 mètres de fil
Hep	Héparine
HP β CD	Hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine
IPV	Infection de prothèse vasculaire
PAA	Acide poly(acrylique)
PET	Polyéthylène Terephtalate
PET-AA	Polythylène terephtalate greffé avec l'acide poly(acrylique)
PET-PF	Polythylène terephtalate traité par plasma froid
PLM	Polymaille®
PLT	Polythèse®
Poly(CTR-HP β CD)	Polymère d'hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine réticulé par de l'acide citrique
RFP	Rifampicine
SIM	Simvastatine
VCY	Vancomycine

PLAN

Avant-propos	2
Dédicaces et remerciements	3
Glossaire	6
PLAN	7
1 INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	11
2 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	14
2.1 Les biomatériaux textiles en chirurgie vasculaire.....	14
2.1.1 Notice historique.....	14
2.1.2 Usage actuel des biomatériaux textiles en chirurgie vasculaire.....	15
2.1.3 Les revêtements prothétiques d'étanchéification.....	16
2.1.4 Le cahier des charges du greffon prothétique idéal	17
2.2 Problématique liée à l'utilisation des prothèses en chirurgie vasculaire.....	18
2.2.1 La thrombogénicité intrinsèque des biomatériaux vasculaires.....	18
2.2.2 Les infections prothétiques	20
2.2.3 Les occlusions tardives par hyperplasie myo-intimale	22
2.3 Inventaire des systèmes expérimentés pour améliorer les matériaux prothétiques vasculaires.....	22
2.3.1 Les modifications à l'oxyde nitrique (NO).....	23
2.3.2 Les revêtements organiques	25
2.3.2.1 Revêtement de Carbone.....	25
2.3.2.2 Revêtement fluoré	26
2.3.2.3 Revêtement de sulfure de polypropylène sulfure—polyéthylène glycol.....	26
2.3.2.4 Revêtement phospholipidique	27
2.3.2.5 Revêtement en poly-1,8-octanediol citrate	28
2.3.3 Les revêtements protéiques	28
2.3.3.1 Revêtement par l'albumine	28
2.3.3.2 Revêtement par un polymère d'élastine.....	29
2.3.3.3 Revêtement par le peptide P15	29
2.3.3.4 Revêtement par les anticorps anti-CD34.....	29
2.3.3.5 Revêtement par le peptide Arg-Gly-Asp cyclique liant les intégrines	30
2.3.3.6 PTFE modifié avec le facteur de croissance fibroblastique	30
2.3.4 Revêtement cellulaire des prothèses vasculaires et ingénierie tissulaire	31
2.3.4.1 Le revêtement par les cellules endothéliales ou par les cellules souches.....	31
2.3.4.2 Le revêtement par des cellules mésenchymateuses génétiquement modifiées (Prothèses biohybrides)	31
2.3.4.3 Le revêtement par des nanofibres	33
2.3.5 Les systèmes d'immobilisation et de libération de médicaments.....	34
2.3.5.1 Molécules anticoagulantes.....	34
2.3.5.2 Les agents thrombolytiques	35
2.3.5.3 Les agents antiagrégants plaquettaires	36
2.3.5.4 Les agents anti-mitotiques.....	36
2.4 Limitations des systèmes inventoriés pour améliorer les matériaux prothétiques vasculaires.....	37
3 BUT ET STRUCTURATION DES PRESENTS TRAVAUX	38
4 PARTIE EXPÉRIMENTALE	40
CHAPITRE I : Les prothèses vasculaires fonctionnalisées par un polymère d'hydroxypropyl-β-cyclodextrine pour la libération contrôlée et prolongée de principes actifs.	40

4.1	Généralités sur la fonctionnalisation des prothèses vasculaires par les cyclodextrines	40
4.1.1	Les cyclodextrines.....	40
4.1.2	Le concept du PET fonctionnalisé par un polymère de cyclodextrines	42
4.1.3	Résumé des travaux antérieurs du groupe sur le concept	43
4.1.3.1	Développement et optimisation du procédé de fonctionnalisation des prothèses en PET par les cyclodextrines	43
4.1.3.2	Étude des interactions de l'HPβCD avec certains antibiotiques	44
4.1.3.3	Validation du concept de libération de principes actifs à partir de prothèses vasculaires en PET fonctionnalisées par la cyclodextrine	45
4.1.4	Limitations des connaissances sur le PET fonctionnalisé par poly-CTR-HPβCD	46
4.1.5	Objectifs des travaux suivants.....	47
4.2	Matériels et méthodes	47
4.2.1	Matériels.....	47
4.2.1.1	Les prothèses vasculaires.....	47
4.2.1.2	Les agents antimicrobiens	48
4.2.1.3	Les modèles animaux.....	50
4.2.1.3.1	Le modèle murin de contamination bactérienne intense	51
4.2.1.3.2	Le modèle canin d'implantation prothétique en position fonctionnelle	52
4.2.2	Méthodes	52
4.2.2.1	Cinétique d'adsorption et de libération des agents anti-microbiens	52
4.2.2.1.1	Capacité d'adsorption de PLM-CD.....	52
4.2.2.1.2	Cinétique de libération en flux continu (méthode USP-IV).....	53
4.2.2.1.2.1	La méthode USP IV	53
4.2.2.1.2.2	Dosage des antibiotiques libérés.....	55
4.2.2.2	Evaluation du temps et des produits de dégradation du poly-HPβCD	56
4.2.2.2.1	Dégradation <i>in vitro</i> en milieu salin (NaCl 0.9%).....	56
4.2.2.2.2	Dégradation <i>in vitro</i> dans le plasma humain	56
4.2.2.2.3	Dégradation <i>in vivo</i> dans le modèle canin d'implantation prothétique	57
4.2.2.3	Innocuité de PLM-CD implantée dans un modèle canin	57
4.2.2.4	Efficacité antimicrobienne de PLM-CD chargée d'antibiotiques.....	59
4.2.2.4.1	Les souches bactériennes	59
4.2.2.4.2	Test d'adhésion bactérienne (<i>in vitro</i>).....	61
4.2.2.4.3	Test d'inhibition de la croissance bactérienne (<i>in vitro</i>)	62
4.2.2.4.4	Activité antibactérienne <i>in vivo</i>	63
4.2.2.5	Analyse statistique	64
4.3	Résultats	65
4.3.1	Capacité d'adsorption et cinétique de libération des agents antimicrobiens	65
4.3.1.1	Apport du poly-CTR-HPβCD sur la capacité d'adsorption	65
4.3.1.2	Influence du temps d'imprégnation.....	65
4.3.1.3	Influence de la concentration de la solution d'antibiotique	66
4.3.1.4	Cinétique de libération en flux continu (méthode USP4).....	68
4.3.2	Cinétique de dégradation du poly-CTR-HPβCD.....	71
4.3.2.1	Dégradation <i>in vitro</i> en milieu salin isotonique	71
4.3.2.2	Dégradation <i>in vitro</i> en milieu plasmatique humain	72
4.3.2.3	Biodégradation dans le modèle canin de pontage carotidien.....	73
4.3.2.4	Etude de la dégradation du poly-CTR-HPβCD par spectrométrie de masse	74
4.3.3	Innocuité et cicatrisation de PLM-CD	78
4.3.4	Efficacité antibactérienne de PLM-CD chargée d'antibiotiques	84
4.3.4.1	Propriétés anti-adhésion bactérienne <i>in vitro</i>	84
4.3.4.2	Inhibition de la croissance bactérienne <i>in vitro</i>	86
4.3.4.3	Propriétés antibactériennes <i>in vivo</i>	89
4.3.5	Activation de PLM-CD par une association d'antibiotiques	93
4.3.5.1	Capacité différentielle d'adsorption en antibiotiques.....	93
4.3.5.2	Interactions ciprofloxacine/rifampicine en solution	93
4.3.5.3	Efficacité de PLM-CD chargée de rifampicine/ciprofloxacine	94
4.3.5.3.1	Activité contre l'adhésion bactérienne (<i>in vitro</i>)	94
4.3.5.3.2	Activité contre la prolifération bactérienne (<i>in vitro</i>)	95

4.3.5.3.3	Activité antibactérienne (in vivo).....	97
4.4	Discussion.....	98
4.5	Conclusion:	103

CHAPITRE II: Les prothèses fonctionnalisées par un polymère d'acide

poly(acrylique) pour l'immobilisation de principes actifs..... 104

4.6	Généralités sur la fonctionnalisation par immobilisation de principes actifs	104
4.6.1	Limitations théoriques du concept de libération prolongée de principes actifs.....	104
4.6.2	Le principe de l'immobilisation de principes actifs.....	105
4.6.3	Systèmes d'immobilisation de principes actif sur un biomatériau.....	105
4.6.3.1	Adsorption physique	105
4.6.3.2	Immobilisation chimique directe	105
4.6.3.3	Immobilisation chimique après une phase de prétraitement	106
4.6.3.3.1	Par greffage Photochimique.....	106
4.6.3.3.2	Par activation aux carbodiimides	107
4.6.3.3.3	Par ligation chimio sélective	107
4.6.3.3.4	Par ajout de polyéthylène glycol bi aminé.....	107
4.6.3.3.5	Par traitement plasma froid.....	108
4.6.4	Fonctionnalisation des prothèses vasculaires par traitement plasma froid.....	109
4.6.4.1	Généralités sur les plasmas froids	109
4.6.4.2	Etudes antérieures sur le plasma froid appliqué aux prothèses vasculaires.....	112
4.6.5	Objectifs des présents travaux	114
4.6.6	Le concept développé.....	115
4.6.7	Choix des molécules bioactives.....	115
4.6.8	Composition du bras espaceur.....	118
4.7	Matériels et méthodes	120
4.7.1	Matériels.....	120
4.7.1.1	Le polyéthylène téréphtalate	120
4.7.1.2	Les produits chimiques.....	121
4.7.1.3	Les principes actifs.....	122
4.7.2	Méthodes	122
4.7.2.1	Activation du polyester par traitement plasma froid	122
4.7.2.2	Greffage de l'acide acrylique	122
4.7.2.3	Immobilisation de molécules bioactives après greffage d'acide polyacrylique.....	123
4.7.2.3.1	Fixation sans agent espaceur de la simvastatine et de l'héparine	123
4.7.2.3.2	Fixation à l'aide d'un agent espaceur de la molécule EP224283.....	125
4.7.2.3.2.1	Fixation de l'agent espaceur bNH ₂ -PEG.....	125
4.7.2.3.2.2	Biotinylation de l'agent espaceur bNH ₂ -PEG et complexation avec l'avidine..	126
4.7.2.3.2.3	Immobilisation proprement dite de la EP224383	127
4.7.2.4	Caractérisation physico-chimique de la fonctionnalisation du PET	127
4.7.2.4.1	Dosage colorimétrique des fonctions carboxyles présentes à la surface	127
4.7.2.4.2	Dosage colorimétrique des fonctions amines présentes à la surface.....	128
4.7.2.4.3	Mesure de l'angle de goutte	129
4.7.2.4.4	Analyse Thermo-gravimétrique (ATG)	129
4.7.2.4.5	Microscopie électronique à balayage (MEB).....	130
4.7.2.4.6	La Microscopie à Force Atomique (AFM)	130
4.7.2.4.7	Spectroscopie infrarouge.....	130
4.7.2.4.8	Evaluation de la résistance mécanique des échantillons	130
4.7.2.5	Evaluation biologique de la fonctionnalisation du PET.....	131
4.7.2.5.1	Les cellules et les cultures cellulaires	131
4.7.2.5.2	Test de cytotoxicité par la mesure de la vitalité cellulaire (Bleu Alamar)	132
4.7.2.5.3	Test d'hémocompatibilité par la mesure de l'index d'hémolyse	132
4.7.2.5.4	Les tests plaquettaires.....	133
4.7.2.5.4.1	L'adhésion plaquettaire in vitro.....	133
4.7.2.5.4.1.1	Préparation de concentrés plaquettaire.....	133
4.7.2.5.4.1.2	Détermination d'une échelle de densité optique de référence.....	134
4.7.2.5.4.1.3	Détermination de nombre de plaquettes adhérees sur des supports en PET	

4.7.2.5.4.2	Cinétique d'agrégation plaquettaire in vitro	135
4.7.2.5.5	Les tests de coagulation sanguine au contact du PET fonctionnalisé.....	135
4.7.2.5.5.1	Cinétique de coagulation sanguine	135
4.7.2.5.5.2	Temps de céphaline activée	136
4.7.2.6	Analyse statistique.....	136
4.8	Résultats	136
4.8.1	Greffage de fonctions carboxyles à la surface du PET	136
4.8.1.1	Optimisation et caractérisation du traitement plasma froid	136
4.8.1.2	Optimisation des paramètres pour le greffage du PAA	137
4.8.1.2.1	Influence de la température et du temps sur le greffage	137
4.8.1.2.2	Influence de la concentration en AA sur le greffage.....	138
4.8.2	Caractérisation physique du greffage	139
4.8.2.1	Energie de surface	139
4.8.2.2	Analyse thermo-gravimétrique	139
4.8.2.3	Analyse en microscopie à force atomique	140
4.8.2.4	Analyse en microscopie électronique à balayage.....	141
4.8.2.5	Les essais mécaniques.....	142
4.8.3	Evaluation biologique du greffage.....	143
4.8.3.1	Cytocompatibilité du greffage.....	143
4.8.3.1.1	Effets sur les cellules endothéliales	143
4.8.3.1.2	Effets sur les cellules musculaires.....	144
4.8.3.2	Hémocompatibilité du greffage.....	146
4.8.3.2.1	Index hémolitique au contact du sang total	146
4.8.3.2.2	Effets sur l'adhésion plaquettaire.....	147
4.8.3.2.3	Effets sur la cinétique d'agrégation plaquettaire	147
4.8.3.3	Bilan du greffage en vue de la fixation de molécules bioactives.....	148
4.8.4	Immobilisation de la molécule thérapeutique.....	148
4.8.4.1	Immobilisation de la simvastatine	148
4.8.4.1.1	Caractérisation par ATG de la fixation de la simvastatine sur le PET	148
4.8.4.1.2	Effets biologiques de la simvastatine fixée sur le PET-AA.....	149
4.8.4.1.2.1	Sur les cellules endothéliales et musculaires lisses.....	149
4.8.4.1.2.2	Sur l'adhésion plaquettaire	150
4.8.4.2	Immobilisation de l'héparine	151
4.8.4.2.1	Caractérisation par spectroscopie infrarouge de la fixation de l'héparine.....	151
4.8.4.2.2	Effets de la fixation de l'héparine sur l'hydrophilie du PET	153
4.8.4.2.3	Effets de la fixation de l'héparine sur la cinétique de coagulation	153
4.8.4.3	Immobilisation de la molécule EP224283.....	154
4.8.4.3.1	Couplage de l'agent espaceur bNH2-PEG et de la Biotine	154
4.8.4.3.1.1	Caractérisation par dosage des fonctions carboxyles	154
4.8.4.3.1.2	Caractérisation par dosage des fonctions amines.....	155
4.8.4.3.1.3	Caractérisation par spectroscopie infrarouge	156
4.8.4.3.2	Fixation de la EP224283 par liaison Biotine—Avidine—Biotine	157
4.8.4.3.2.1	Caractérisation indirecte de la fixation par le temps de céphaline activée	157
4.8.4.3.2.2	Effets de la fixation de la molécule EP224283 sur la cinétique de coagulation	158
4.9	Discussion.....	159
4.10	Conclusion	162
5	Conclusion générale et perspectives	164
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	166
	RÉSUMÉ	181

1 INTRODUCTION GÉNÉRALE

Voorhees fut en 1951 le premier chirurgien à utiliser une prothèse synthétique (Vinyon®) en remplacement d'une artère (1). Les substituts prothétiques ont été depuis généralisés à grande échelle. Ils sont actuellement utilisés dans des situations cliniques très diverses comme le traitement des anévrismes artériels, la création de shunts artério-veineux chez des malades hémodialysés chroniques et la confection de pontages dans le cadre des maladies occlusives artérielles ou veineuses (2). Avec le vieillissement des populations, la prévalence croissante de l'obésité, du diabète et de l'athérosclérose, l'incidence des atteintes cardiovasculaires est à travers le monde en constante augmentation (3). Aussi, le nombre de prothèses vasculaires implantées pour corriger ces atteintes semble suivre cette évolution. Un certain nombre de matériaux synthétiques, réputés de prime abord compatibles biologiquement, ont été proposés ou expérimentés dans la fabrication des prothèses vasculaires. La plupart n'ont été que brièvement utilisés du fait finalement d'une mauvaise tolérance biologique ou à cause de mauvaises propriétés mécaniques (4).

Deux matériaux se sont imposés et se partagent la quasi-totalité des cas de substitution artérielle prothétique : un polyester, le polyéthylène téréphtalate (PET) connu sous sa dénomination commerciale de Dacron® et le polytétrafluoroéthylène microporeux ou ePTFE (*expanded-PTFE*), connu également sous la dénomination commerciale de Gore-Tex® (5). Ces deux matériaux ont connu dans le temps diverses évolutions et sont actuellement les meilleurs substituts possibles pour les artères de gros calibre. Ils représentent aussi une alternative acceptable dans les cas fréquents d'absence ou d'inadéquation de substituts veineux autologues pour les artères de moyen calibre (6). Ils présentent néanmoins les inconvénients liés à leur relative thrombogénicité, à leur susceptibilité à l'infection et à leur manque relatif de compliance (7). Ces limitations sont d'ailleurs à l'origine de problèmes cliniques compromettant l'utilisation des prothèses vasculaires dans certaines indications. Suivant le contexte clinique dans lequel ces prothèses sont implantées, diverses complications peuvent ainsi survenir. Les plus dramatiques sont la thrombose précoce, les infections prothétiques et les occlusions tardives par hyperplasie myointimale (8-15). Les difficultés de prise en charge de ces complications justifient les efforts déployés dans la recherche de solutions visant à améliorer les matériaux prothétiques. Aucune avancée clinique majeure liée à cette recherche n'a cependant été notée depuis quelques années (2). Le polyuréthane a été utilisé en raison de ses propriétés élastiques comparables aux parois des artères. Les espoirs fondés sur ce matériau ont vite été déçus du fait d'une mauvaise biostabilité conduisant à une

perte rapide de son élasticité après implantation (8). Les tentatives pour augmenter la perméabilité des prothèses vasculaires de petit calibre (< 6 mm) ont également échoué (7). Ainsi, nous ne disposons pas de prothèses de petit diamètre pour les revascularisations coronariennes, jambières ou plus généralement de tout territoire anatomique tributaire d'un vaisseau de calibre inférieur à 5 mm (16). La recherche de biomatériaux vasculaires actifs n'a pas non plus réussi à incorporer dans la pratique clinique des prothèses vasculaires pourvues d'un système performant capable de délivrer *in situ* un ou plusieurs antibiotiques de choix pour la prévention ou le traitement des infections artérielles. L'amélioration de la biocompatibilité du PET et du ePTFE par le revêtement de cellules souches ou de cellules endothéliales est en cours de développement mais n'est à l'origine d'aucune stratégie efficace et cliniquement viable à ce jour (11).

Au cours de ces dernières années, l'arsenal thérapeutique des revascularisations s'est enrichi des techniques endovasculaires avec, en particulier, l'utilisation de *stents* fabriqués à partir de plusieurs métaux ou alliages métalliques. Au-delà des nuances des propriétés physico-chimiques des métaux et alliages proposés par l'industrie, il est possible de recouvrir ces *stents* avec des produits biologiquement actifs. Cette dernière technique est remarquable et, en dépit de certaines limitations, est largement utilisée pour le stenting actif d'artères coronaires pathologiques (4, 13). Par ailleurs, la technologie des *stents* associée aux connaissances acquises sur les matériaux prothétiques a permis le développement des endoprothèses couvertes (17) pour le traitement des anévrysmes artériels. Ces endoprothèses couvertes ont été, au cours de ces dernières années, à la base de l'évolution sans précédent des pratiques chirurgicales cardiovasculaires traditionnelles vers les techniques mini invasives. Il est devenu ainsi possible de traiter par voie percutanée les anévrysmes aortiques thoraco-abdominaux les plus complexes en utilisant des endoprothèses couvertes, fenêtrées ou multibranches, complétées d'extensions (de diamètre supérieur à 5 mm) dédiées aux artères rénales, viscérales et digestives (18, 19). Ces endoprothèses couvertes composées d'une armature métallique recouverte d'un textile en ePTFE ou en PET peuvent néanmoins être sujettes aux mêmes écueils que les prothèses vasculaires classiques à savoir : thrombogénicité immédiate du textile (limitation de calibre à plus de 5 mm), susceptibilité aux infections et occlusions tardives par hyperplasie myointimale liée à une compliance élastique limitée. De même, il existe un intérêt certain pour la recherche de stratégies capables d'améliorer la cicatrisation et l'intégration tissulaire de ces endoprothèses au niveau de leurs sites d'ancrage afin de prévenir les endofuites, les migrations de dispositifs et les phénomènes dits d'endotension (20-22).

La technologie de fabrication des endoprothèses couvertes comme celle des prothèses vasculaires classiques n'a toujours pas intégré avec efficacité le concept de fixation ou libération de principes actifs couramment appliqué pour la fabrication des stents coronaires. Cela peut paraître étonnant car les endoprothèses couvertes et les prothèses vasculaires classiques présentent par leur composante textile une surface considérable, potentiellement utilisable pour la fixation de nombre d'agents bioactifs. Beaucoup d'agents potentiellement actifs sur les thromboses aiguës, les resténoses et les occlusions tardives des prothèses vasculaires ont une toxicité systémique. D'autres peuvent être administrés par voie parentérale (antibiotiques, antithrombotiques, anticoagulants, etc.) mais la concentration atteinte au niveau de la paroi vasculaire reste en dessous du seuil thérapeutique. Ainsi, l'intérêt est grandissant pour des prothèses vasculaires pouvant servir de point d'ancrage aux cellules progénitrices endothéliales ou de plateforme pour la fixation et/ou la libération locale d'agents thérapeutiques.

Les travaux effectués récemment dans nos unités de recherche (U1008, Univ. Lille 2 et UMET, Univ. Lille 1) ont démontré la faisabilité de fonctionnaliser les prothèses vasculaires en PET par un polymère de cyclodextrines pour la libération locale et prolongée de principes actifs (23-27). Les objectifs de mes travaux de thèse étaient doubles :

- 1°) Évaluer la biocompatibilité, la sécurité et l'efficacité *in vitro* et *in vivo* du concept des prothèses vasculaires en PET revêtues d'un polymère de cyclodextrines pour la libération de principes actifs.
- 2°) Développer, caractériser puis évaluer un concept alternatif d'immobilisation de molécules bioactives d'intérêt sur des prothèses vasculaires en PET en vue d'obtenir des propriétés biologiques spécifiques.

2 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 *Les biomatériaux textiles en chirurgie vasculaire*

2.1.1 Notice historique

Entre les travaux d'Alexis Carrel ayant abouti à Lyon (France) à la mise au point des techniques de l'anastomose vasculaire (28, 29), et l'implantation réussie à Paris (France) en 1951 de la première allogreffe artérielle chez l'homme par Jacques Oudot (30), il s'est écoulé une cinquantaine d'années. Le premier substitut vasculaire de synthèse fut développé parallèlement aux Etats-Unis d'Amérique puis évalué dans un modèle canin de pontage aortique par Voorhes et ses collaborateurs au cours des années quarante (1). La première implantation de ce substitut synthétique chez l'homme est à porter au crédit de ces mêmes auteurs américains. Elle est datée d'une dizaine d'années plus tard, en 1952, soit un an après l'exploit chirurgical d'Oudot à Paris. Cette première implantation chez l'homme d'un matériau synthétique en position vasculaire se conclut toutefois une trentaine de minutes plus tard par la mort du malade (1). Cette tentative malheureuse eut en revanche le mérite de susciter très tôt un intérêt croissant pour les matériaux textiles en chirurgie vasculaire. D'ailleurs, l'évolution de la chirurgie cardiovasculaire a par la suite suivi les progrès dans la conception et la fabrication des biomatériaux en général et des biomatériaux textiles en particulier.

Cette première prothèse historique (poreuse et tubulaire) fut réalisée en fibres tricotées de chlorure de polyvinyle (Vinyon®) (1). Des matériaux divers ont été ensuite évalués dans la confection des substituts vasculaires synthétiques. La soie, l'ivoire, certains métaux, des fibres de verre, des fibres de polyamide 6.6 (Orlon®, Ivalon® et Nylon®) ont tous été testés avec des fortunes diverses. Leur usage a très rapidement périclité du fait de mauvaises propriétés physiques. Leur talon d'Achille commun fut constitué par une faible résistance au « *Shear Stress* » une fois exposés au courant sanguin, responsable de nombreux états catastrophiques de dégradations rapides et de ruptures secondaires fatales.

Le PET (Dacron®) fut développé en Grande Bretagne par les chimistes J. R. Whinfield et J.T. Dickinson vers les années 1941. Le point de fusion élevé de ce matériel thermoplastique facilement façonnable en fils le rend idéal pour des applications textiles industrielles. Le PET oppose en plus aux situations de stress mécanique une résilience importante conférée par la

présence de cycles aromatiques renforçant les liaisons chimiques au sein du polymère. Michael De Bakey fut dans ce contexte le premier à utiliser le PET pour une reconstruction aortique après l'avoir modelé artisanalement en utilisant la machine à coudre de son épouse. Quant au PTFE, il fut d'abord développé par Roy Plunkett en 1938 puis commercialisé en 1945 sous le nom de Teflon® avant d'être modifié sous sa forme microporeuse actuelle d'ePTFE (*expanded PTFE* ; GoreTex®) par des chercheurs de W.L. Gore & Associates, inc.(8).

2.1.2 Usage actuel des biomatériaux textiles en chirurgie vasculaire

L'utilisation de matériaux synthétiques (PET et ePTFE) pour la confection de substituts vasculaires a vite supplanté les allogreffes pour devenir depuis De Bakey et coll.(31) le gold standard dans des indications précises comme le traitement des lésions anévrismales ou occlusives à l'étage aorto-iliaque. La Figure 1 montre le marché actuel des prothèses vasculaires implantées en position abdominale chaque année dans les quatre pays les plus peuplés de l'union européenne.

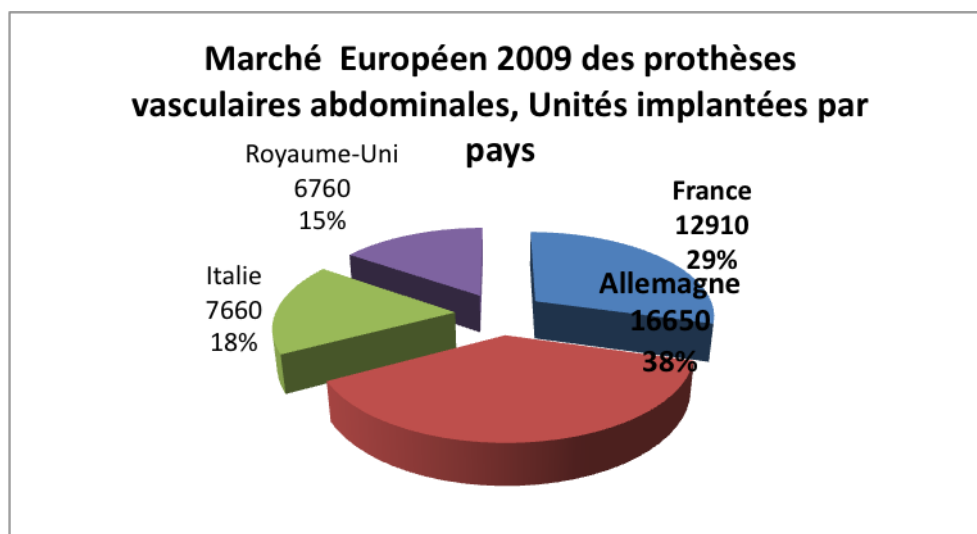


Figure 1 : Marché des prothèses vasculaires abdominales en Europe occidentale.
Données source : Pérouse médical

Les matériaux prothétiques sont également utilisés en nombre élevé (**Figure 2**) pour remplacer les artères périphériques mais avec des résultats cliniques largement perfectibles. Dans une grande étude prospective randomisée, le taux de perméabilité des pontages prothétiques infra-géniculés était ainsi de seulement 54% à 4 ans comparé au taux de 76% obtenu dans les mêmes conditions avec un matériel veineux autologue (32).

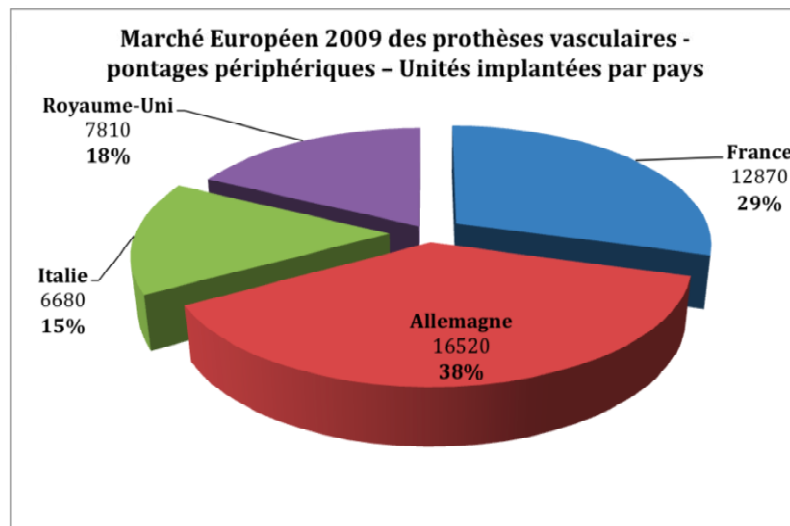


Figure 2 : Marché des prothèses vasculaires périphériques en Europe occidentale.
Données source : Pérouse médical

L'amélioration de la composante textile des endoprothèses couvertes a été déterminante dans l'essor exponentiel qu'a connu la chirurgie vasculaire mini invasive au cours des deux dernières décennies. Le problème des endofuites de type IV par excès de porosité du matériau textile, rencontré avec les premières générations d'endoprothèses couvertes aortiques, a par exemple été résolu. Les nouveaux dispositifs vasculaires implantés par voie percutanée en cas de lésions artérielles occlusives ou anévrismales ont ainsi permis de traiter des malades qui seraient parfois inopérables avec les méthodes chirurgicales classiques (33).

2.1.3 Les revêtements prothétiques d'étanchéification

La porosité relative des matériaux synthétiques vasculaires est apparue très tôt comme un critère déterminant favorable de leur incorporation au niveau des tissus de l'hôte (34). Une porosité très élevée reste toutefois délétère par l'importance des pertes sanguines qu'elle peut occasionner. Ainsi, jusqu'au début des années quatre-vingts une étape de « pré-caillotage » était nécessaire lors des implantations humaines de prothèses vasculaires afin de limiter les pertes sanguines (35). Une étape cruciale du développement des biomatériaux vasculaires a été sans doute l'obtention de substituts synthétiques en PET déjà étanchéifiés industriellement. Les agents utilisés pour obtenir cette étanchéité ont fait l'objet de nombreuses investigations à la fois en pratique clinique et en laboratoire. Les revêtements prothétiques (« *coating* ») utilisés pour étanchéifier les prothèses en PET ont en commun de se résorber en 4 à 12 semaines après l'implantation, laissant ainsi la place pour l'incorporation du PET aux tissus de l'hôte (36). Ces revêtements doivent de plus être non toxiques, non allergisants et peu thrombogènes. Ceux en usage actuellement sont des polymères protéiques

d'origine humaine ou animale, mais sont de plus en plus souvent obtenus par synthèse chimique ou génie génétique depuis la découverte des infections rétrovirales et des zoonoses à prions. On peut citer l'albumine, la gélatine et le collagène utilisés sous une forme réticulée ou non réticulée. Ces protéines de revêtement offrent pour certaines la possibilité d'établir des liaisons ioniques avec des antibiotiques comme la rifampicine (37-39), et pour d'autres celle d'emprisonner dans leur matrice des antiseptiques comme le triclosan ou les sels d'argent (40, 41). Les substances ainsi emprisonnées sont libérées plus ou moins rapidement au fil de la biodégradation de la matrice après l'implantation prothétique.

2.1.4 Le cahier des charges du greffon prothétique idéal

Les caractéristiques idéales (42) du greffon prothétique vasculaire sont résumées dans le Tableau 1

Tableau 1 : Adapté de Machy D et al (42)	
Caractéristiques idéales des biomatériaux prothétiques vasculaires	
Biocompatible	<ul style="list-style-type: none"> • Non thrombogène • Non toxique au cours de sa dégradation • Non carcinogène • Non allergisant • Peu traumatisant pour les éléments figurés du sang • Non activateur du système complément ou de la cascade de coagulation • Résistant aux infections
Compliant	<ul style="list-style-type: none"> • Flexible, élastique, sans tendance à constituer des plicatures • Résistant à l'hyperplasie myointimale
Facilement maniable	<ul style="list-style-type: none"> • Propriétés physiques et chimiques adéquates pour une bonne durabilité • Facile à planter et à suturer • Facile à stériliser et à stocker • Disponible en tailles et diamètres variés
Optionnel	<ul style="list-style-type: none"> • Capable de libérer des médicaments • A faible coût

2.2 Problématique liée à l'utilisation des prothèses en chirurgie vasculaire

Les prothèses vasculaires classiques comme les endoprothèses sous leur forme actuelle constituent une solution mécanique à des problèmes biologiques. Elles sont exposées, une fois implantées dans le corps humain, à un certain nombre de complications comme l'infection, la resténose et les occlusions tardives, chacune avec morbidité et mortalité propres.

2.2.1 La thrombogénicité intrinsèque des biomatériaux vasculaires

La thrombogénicité résulte de l'activation des plaquettes et de la cascade de coagulation au contact d'un matériel exogène. Quoiqu'il existe des matériaux qui soient moins thrombogènes qu'un autre, tout matériau étranger implanté dans l'organisme déclenche un certain degré de thrombogénicité (43, 44). Quand vient le sang en contact d'un implant étranger, des protéines plasmatiques s'adsorbent à la surface du biomatériau (Figure 3) et y forment une couche protéique d'environ 100–200 Å d'épaisseur (44, 45). La nature et la quantité de protéines adsorbées dépendent des propriétés physiques et chimiques du biomatériau implanté (46). Cette couche protéique constitue le substrat pour l'adhésion plaquettaire et l'activation de la voie intrinsèque de la coagulation. Les plaquettes au contact s'agrègent, s'activent, se dégranulent et s'adhèrent à la surface (47, 48). Ils contribuent ainsi à constituer le thrombus par polymérisation du fibrinogène en fibrine et recrutement de globules rouges (Figure 3).

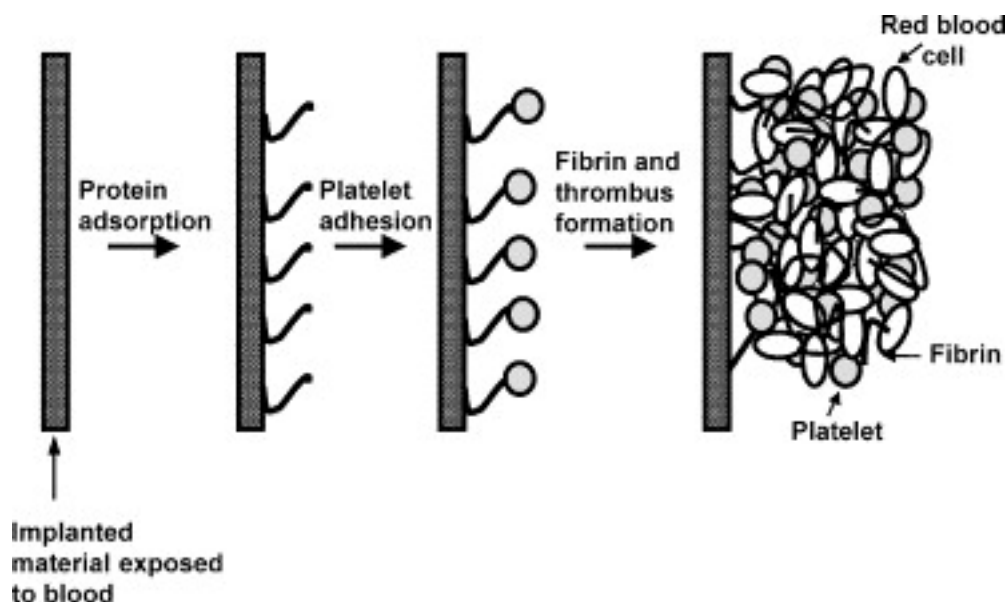


Figure 3 : Réponse biologique au contact d'un implant synthétique au contact du sang (44).

La voie intrinsèque de la coagulation rapportée en détail dans la Figure 4 est déclenchée via l'autoactivation du facteur XII en facteur XIIa au contact elle aussi du matériau prothétique.

Ce processus d'activation est réalisé en présence de protéases sériques de type prékallikréine et des facteurs du kininogène plasmatique.

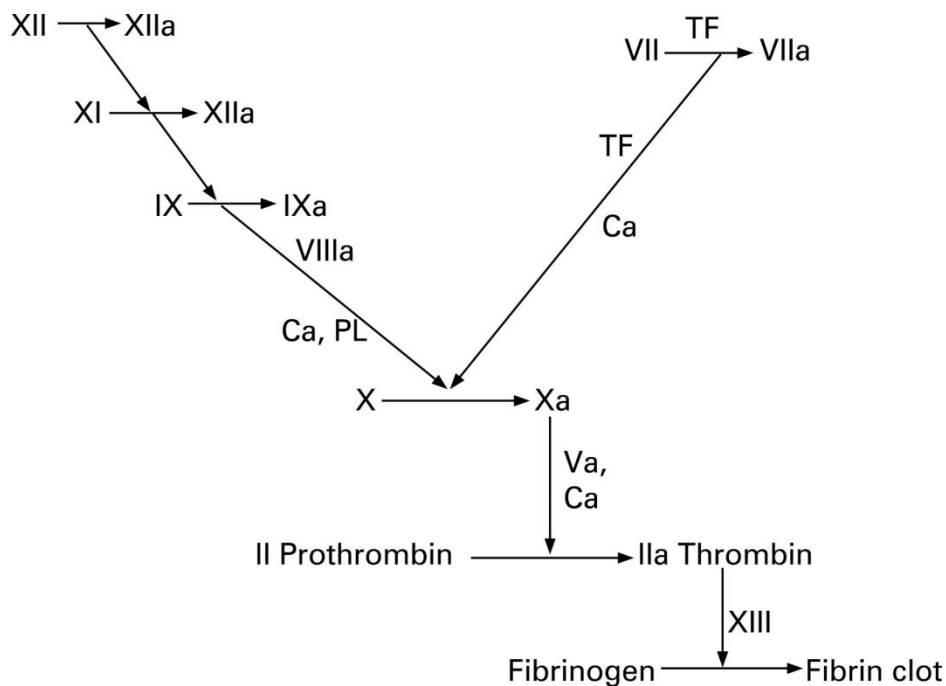


Figure 4 : Voies de la coagulation sanguine

Les matériaux étrangers implantés dans le réseau vasculaire provoquent de plus des niveaux plasmatiques élevés de : thrombomoduline, thromboxane B2, facteur XIIa, éléments du complément et leucocytes circulants qui sont tous des facteurs susceptibles de promouvoir les phénomènes thrombotiques (47).

La thrombogénicité est rarement un problème immédiat quand il est question de prothèses et d'artères de bon calibre. La thrombogénicité intrinsèque des matériaux textiles reste un critère déterminant et actuellement rédhibitoire pour la conception des prothèses et des endoprothèses vasculaires couvertes de petits diamètres (< 6 mm) (8). Les substituts prothétiques textiles sont dépourvus de la couche native de cellules endothéliales produisant l'oxyde nitrique (NO) capable d'empêcher les phénomènes de thrombose *in situ*. De plus la circulation relativement ralentie dans des conduits de tels calibres exposerait encore davantage aux phénomènes thrombotiques (8). Une approche possible pour obvier à ces difficultés serait de doter les biomatériaux textiles en un système capable de bloquer ou de limiter l'activation plaquettaire et/ou d'interagir avec la cascade de la coagulation. Des substituts vasculaires de petits calibres pourraient être ainsi synthétisés (2).

2.2.2 Les infections prothétiques

Les infections de prothèses vasculaires (IPV) représentent une affection rare (1 malade/an/100000 habitants) mais gravissime (49). Selon les séries, la mortalité peut aller de 10% pour l'infection d'une prothèse périphérique à 50% quand la prothèse siège au niveau aortique. De plus, parmi les malades survivant au traitement chirurgical des IPV, il existe un risque non négligeable d'invalidité avec 21% d'amputations (50, 51).

Les IPV relèvent d'espèces bactériennes très diverses. La plupart sont secondaires à la contamination du site opératoire ou de la prothèse par des bactéries au moment de l'opération. Ainsi prédominent, les bactéries de la flore cutanée comme *Staphylococcus epidermidis* mais aussi *Staphylococcus aureus* qui peut-être transitoirement porté par la peau (49). Il n'est pas superflu de rappeler ici l'émergence fréquente de germes mutants résistants dans les cas de séjours hospitaliers prolongés préalables (52). En présence de troubles trophiques, d'autres germes disséminés par voie lymphatique ou par voie hématogène peuvent infecter la prothèse : *Pseudomonas aeruginosa* ou des souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (MRSA). De même les chirurgies comportant un abord inguinal peuvent se compliquer d'une contamination par les germes de la flore digestive en plus de ceux de la flore cutanée saprophyte. Ainsi les entérobactéries, en particulier *Escherichia coli*, et des bactéries anaérobies, telles que *Bacteroides fragilis*, peuvent être en cause dans les IPV (53). En plus de ces germes, des levures peuvent être retrouvées dans les cas d'IPV secondaires à une fistule aorto-digestive (54).

Ces infections peuvent se manifester cliniquement après l'implantation du substitut prothétique vasculaire de manière précoce (< 4mois) ou peuvent se révéler plus tardivement (> 4mois). Le délai de survenue des symptômes a un rapport théorique avec le moment de l'inoculation bactérienne. Celle-ci peut évidemment se produire, postérieurement à l'implantation prothétique, à la faveur d'épisodes infectieux intercurrents ou lors de fautes d'asepsie au cours de gestes vasculaires invasifs subséquents. Ceci d'autant que l'encapsulation (de la prothèse vasculaire dans les tissus de l'hôte) n'aura pas été encore complète. Mais en pratique, dans la majorité des cas, ce délai de survenue semble déterminé par l'importance de la charge bactérienne au moment de la contamination et surtout par la virulence du ou des germes impliqués. Ainsi des bactéries à faible virulence, comme les Staphylocoques à coagulase négative, peuvent rester quiescentes des mois, voire des années après l'inoculation, protégées par le biofilm avant d'aboutir à une IPV cliniquement manifeste (55).

Le traitement des IPV comporte l'ablation du matériel infecté couplée à l'excision et au drainage des tissus infectés de voisinage. Le rétablissement de la continuité vasculaire peut être assuré *in situ* ou au moyen d'un pontage extra anatomique (56). La morbi-mortalité élevée des IPV peut être liée à un certain nombre de facteurs incluant l'état général des malades, l'évolution de la maladie athéromateuse sous-jacente, et la gravité du tableau septique initial. Toutefois, la persistance et/ou la récurrence de l'infection après le traitement initial expliquent un certain nombre de cas d'échecs précoces ou tardifs assombrissant les résultats. Malgré la prolongation de l'antibiothérapie systémique postopératoire, le taux de récurrences reste considérablement élevé (54, 57).

Les veines fémorales superficielles, du fait d'une plus faible susceptibilité à la réinfection (58), sont devenues le substitut vasculaire de premier choix en milieu septique ou fortement contaminé (56, 59, 60). On leur reconnaît quelques limitations comme l'allongement du temps opératoire pouvant être préjudiciable au succès clinique de la procédure. Le prélèvement des veines fémorales superficielles peut se compliquer de syndrome de loges aigu postopératoire voire d'une insuffisance veineuse chronique (61-63). De surcroît, l'utilisation des veines fémorales superficielles comme substitut vasculaire n'est pas toujours réalisable: longueur disponible, antécédents de phlébite, antécédents d'ablation du réseau veineux superficiel (64). De nombreuses alternatives existent et incluent notamment les allogreffes cryopréservées et les prothèses imprégnées de rifampicine. Nous avons utilisé hors protocole dans cette indication des prothèses imprégnées de sels d'argent, mais au prix d'un taux décevant de réinfection à moyen terme (54). Les allogreffes cryopréservées offrent une bonne résistance aux réinfections, mais restent de disponibilité limitée. Elles sont sujettes aux dégradations secondaires dans près d'un quart des cas (65, 66). La rifampicine a l'unique particularité d'établir des liaisons ioniques avec la gélatine utilisée pour étanchéifier les prothèses vasculaires en PET (67). Les prothèses imprégnées de rifampicine se sont montrées efficaces dans plusieurs modèles canins d'infections prothétiques à *S. aureus* ou à *S. epidermidis* (68-70). En pratique clinique, elles ont été utilisées avec succès pour les infections à germes de faible virulence (71). La principale limitation résulte de la diversité écologique des IPV (52, 54, 66). Les études bactériologiques rapportent de plus en plus d'IPV polymicrobiennes, avec des germes naturellement résistants à la rifampicine ou susceptibles de le devenir par sélection de souches résistantes (52, 54, 66). Ceci illustre la nécessité de développer des prothèses vasculaires dotées d'un système de libération prolongée d'agents antimicrobiens qui pourraient ainsi être adaptés localement en fonction des données épidémiologiques ou des résultats bactériologiques d'un malade particulier (5).

2.2.3 Les occlusions tardives par hyperplasie myo-intimale

L'occlusion tardive des substituts vasculaires synthétiques signifie souvent un échec clinique et constitue la première cause d'explantation ou de suppression des prothèses vasculaires. La plupart des cas d'occlusion prothétiques tardives (≥ 6 mois) peuvent être liés à la progression de la maladie athéromateuse ou à la survenue d'une hyperplasie myointimale. L'hyperplasie myointimale survenant au niveau des sites anastomotiques aboutit progressivement à l'occlusion de la lumière vasculaire. D'autres facteurs incluant la qualité du lit d'aval (*outflow*) ou l'état du lit artériel proximal (*inflow*) sont également à prendre en compte mais dépassent grandement les objectifs de ces travaux. L'hyperplasie myointimale peut résulter du différentiel de compliance existant entre l'artère native hôte et la prothèse vasculaire implantée. Les turbulences de flux qui en résultent ainsi que le « *shear stress* » généré aboutissent au développement des sténoses anastomotiques par hyperplasie myointimale (72). De même, dans les cas d'implantation d'endoprothèse couverte un état d'agression constante de la paroi vasculaire est constitué. Les resténoses et les occlusions tardives survenues après la pose des *stents* ou de ces endoprothèses couvertes sont d'ailleurs en rapport également avec cet état d'agression constante de la paroi vasculaire au contact d'un matériel exogène (73). L'hyperplasie myointimale, talon d'Achille des prothèses et endoprothèses vasculaires, est caractérisée par une prolifération musculaire lisse aboutissant à l'occlusion progressive de la lumière vasculaire ou à la thrombose aiguë (74). Le développement de matériels prothétiques innovants doit viser une triple cible pour limiter les phénomènes d'hyperplasie myointimale: 1^o) inhiber la prolifération musculaire lisse, 2^o) garder intacte les capacités de régénérescence endothéliale de la paroi vasculaire, et 3^o) amener une concentration maximale de molécules bio-actives pour avoir une efficacité locale sans induire de toxicité systémique.

2.3 Inventaire des systèmes expérimentés pour améliorer les matériaux prothétiques vasculaires

Une des approches possibles pour améliorer les prothèses vasculaires est l'utilisation de divers revêtements destinés à diminuer la susceptibilité aux infections, la thrombogénicité et/ou l'hyperplasie myointimale. Plusieurs types de revêtement ont fait l'objet d'essais préliminaires. On peut distinguer les modifications à l'oxyde nitrique, des revêtements organiques, lipidiques, polysaccharidiques, protéiques, des revêtements cellulaires et des revêtements enrobant des médicaments (2).

2.3.1 Les modifications à l'oxyde nitrique (NO)

Le NO est produit par les cellules endothéliales et joue un rôle central dans la régulation du tonus vasculaire, la prévention de l'agrégation plaquettaire, et l'inhibition de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses (75). Kapadia et al (8) ont répertorié deux classes de molécules capables de libérer du NO, le diazeniumdiolate et le nitrosothiol qui sont appelées molécules donneuses de NO dont les structures moléculaires sont illustrées à la Figure 5.

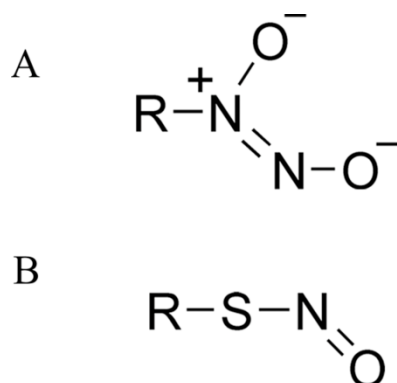


Figure 5 : Formule chimique semi développée de 2 molécules donneuses de NO : A, Diazeniumdiolate et B, S-nitrosothiol

Des investigations expérimentales ont été réalisées en vue de conférer aux biomatériaux les propriétés de ces molécules libérant le NO (44). La fixation de ces molécules à la surface du biomatériau pouvait se concevoir selon plusieurs mécanismes : 1o) en incrustant ces molécules dans la matrice protéique servant à étanchéifier ou à revêtir les biomatériaux (Figure 6A) 2o) en fixant de manière covalente le diazeniumdiolate à une chaîne latérale pendante du polymère (Figure 6B). Ces deux premières stratégies passent néanmoins par des étapes réactionnelles intermédiaires produisant des nitrosamines qui sont par nature essentiellement cancérigènes (44).

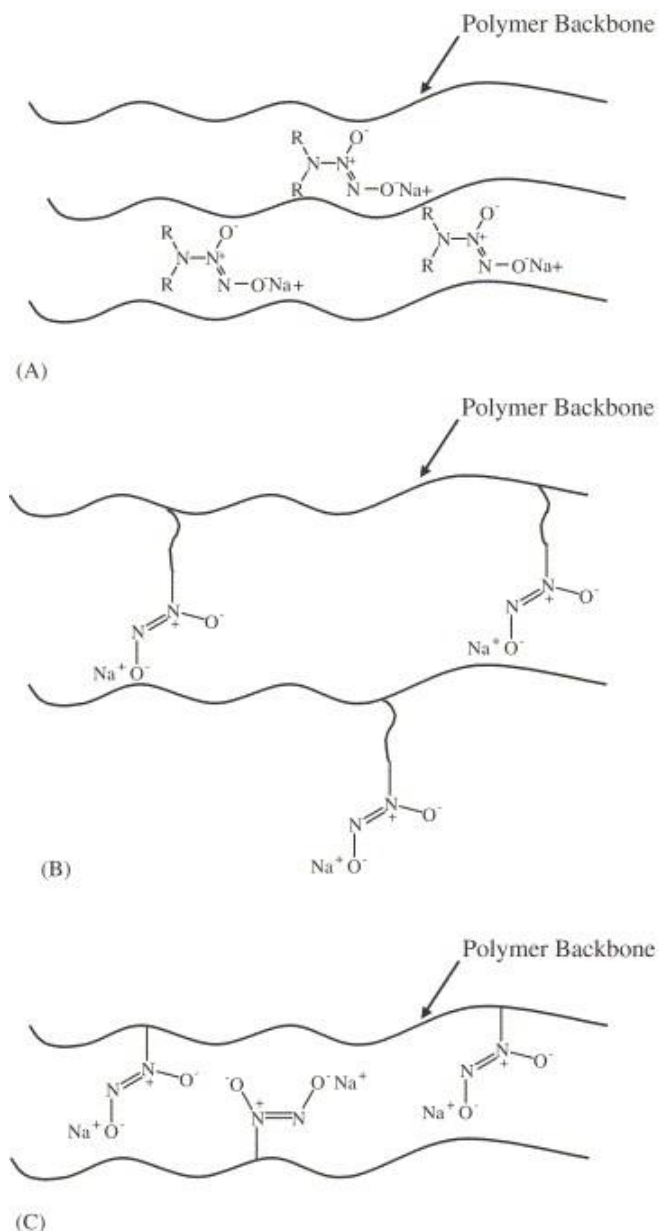


Figure 6 : Illustration schématique des mécanismes réactionnels pour la fixation du diazéniumdiolate à la surface d'un biomatériau polymérique (44).

3o) Des films de polyuréthanes produisant du NO ont été créés par greffage covalent de diazéniumdiolates directement au squelette moléculaire central du polyuréthane (Figure 6). Cette approche évite le recours à des réactions supplémentaires, évitant ainsi le potentiel carcinogène des nitrosamines intermédiaires (76). Jun et coll. (77) ont montré que la production de NO par ces films de polyuréthane pouvait durer deux mois dans des conditions physiologiques *in vitro* (Figure 7). L'adhésion plaquettaire était diminuée, la croissance de cellules musculaires lisses était inhibée, et la croissance de cellules endothéliales était stimulée sur ces prothèses en polyuréthane modifié (Figure 7).

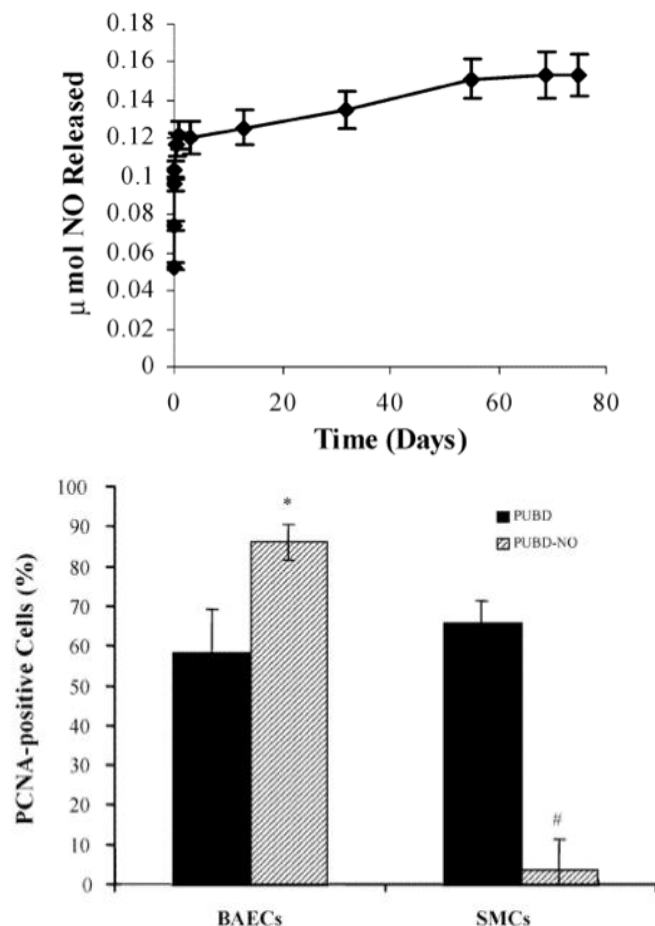


Figure 7 : En haut : Libération de NO par des prothèses en polyuréthane modifiées (77) . En bas : Prolifération de cellules endothéliales aortiques bovines (BAECs) et de cellules musculaires lisses (SMCs) sur des supports en polyuréthane producteur (PUBD-NO) ou non (PUBD) de NO (77).

Il n'y a pas actuellement d'études *in vivo*, ni *à fortiori* d'études cliniques, publiées sur ce genre de prothèse (2) d'autant que les propriétés mécaniques du polyuréthane ont depuis grandement limité son utilisation pour la fabrication des prothèses vasculaires (8).

2.3.2 Les revêtements organiques

2.3.2.1 Revêtement de Carbone

Le carbone est connu pour être biocompatible et anti-thrombotique. Il a été utilisé pour améliorer la biocompatibilité et les propriétés anti-thrombotiques d'un certain nombre de dispositifs cardiovasculaires implantables. Des stents, des prothèses en ePTFE et des valves cardiaques mécaniques, ayant notamment un contact direct avec le flux sanguin, ont été ainsi revêtus de carbone. L'un des procédés de réalisation d'un tel revêtement vise à obtenir un dépôt de vapeurs chimiques de carbone pyrolytique dit graphitique à la surface des biomatériaux. Ce procédé met à profit un hydrocarbure (par exemple le méthane) chauffé à sa

température de décomposition. Une couche de graphite se cristallise alors en un arrangement bien ordonné d'atomes de carbone à la surface de réception du matériau traité (16). Malheureusement, une étude multicentrique prospective randomisée n'a pas réussi à démontrer la supériorité des prothèses en ePTFE recouvertes de carbone (ImpiraTM Carboflo graft, Bard Peripheral Vascular, Inc, Tempe, Ariz) par comparaison aux prothèses en ePTFE standard. Les critères principaux de jugement, au cours de cette étude, étaient la perméabilité primaire, la perméabilité secondaire et le taux de sauvetage de membre (78).

2.3.2.2 Revêtement fluoré

Chinn JA et coll. (79) ont rapporté le revêtement du PET par un fluoropolymère (Fluoropassiv[®], Vascutek) comme pouvant diminuer la réaction inflammatoire, limiter la prolifération fibroblastique et la formation de thrombus au contact de la surface des vaisseaux dans un modèle de shunt artério-veineux chez le babouin. Dans un modèle expérimental de tromboendarterectomie carotidienne chez le chien, d'autres auteurs (80) ont rapporté avec des patches en PET enrobé de fluoropolymères une diminution à 24 heures de la thrombogénicité et une limitation dans l'épaisseur de la couche d'hyperplasie myointimale formée à 6 semaines par rapport au témoin ePTFE. Des résultats cliniques satisfaisants ont été aussi mentionnés chez l'humain avec de tels patches carotidiens (81). Malheureusement, des études cliniques ou d'autres études expérimentales confirmant ces résultats initialement prometteurs font actuellement défaut dans la littérature à l'échelle des endoprothèses ou des prothèses vasculaires en PET utilisées pour les pontages.

2.3.2.3 Revêtement de sulfure de polypropylène sulfure—polyéthylène glycol

Des prothèses vasculaires en ePTFE ont été enrobées à base d'un copolymère à blocs de sulfure de Polypropylène (PPS) —Polyéthylène Glycol (PEG) dont la structure chimique est révélée à la Figure 8. Le revêtement était réalisé via un composé hydrophobe, le phosphate octadécyle (ODP) au niveau des groupements oxydes du substrat selon la schématique générale exposée à la Figure 8. Des prothèses dotées d'un tel revêtement n'ont à ce jour été utilisées que sur des modèles animaux, notamment dans un modèle porcin de shunt artérioveineux (82).

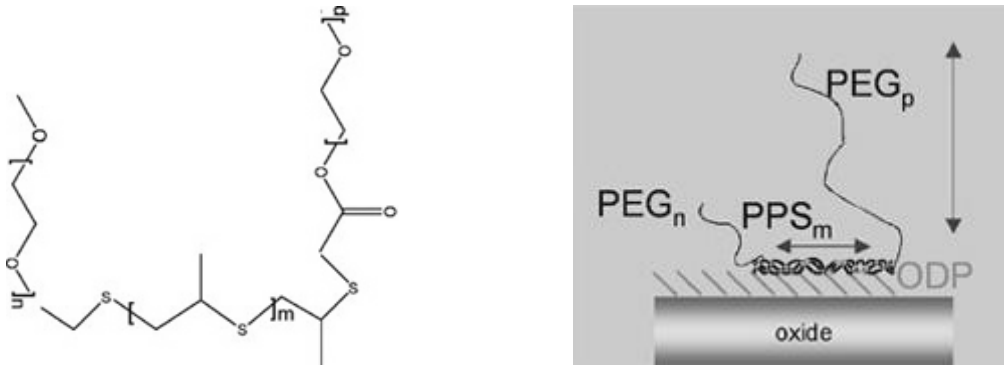


Figure 8 : A gauche : Structure chimique du Polypropylène sulfure —Polyéthylène Glycol. A droite : Schématique de revêtement d'un biomatériau utilisant le polypropylène sulfure—polyéthylène glycol

(Source :

http://www.surface.mat.ethz.ch/research/implants/gold_surfaces/pps_peg/index)

Dans ce modèle, une analyse en microscopie électronique a été réalisée sur les prothèses implantées en vue de déceler des dépôts cellulaires et l'accumulation de micro thrombus. La prothèse en ePTFE recouverte de PPS-PEG a montré par rapport au témoin une diminution significative de la thrombogénicité, mais seulement quand une héparinisation systémique adjuvante était administrée (82).

2.3.2.4 Revêtement phospholipidique

En utilisant le procédé de la photopolymérisation *in situ*, Jordan et coll. (83) ont appliqué un film de phosphocholine sur la surface endoluminale d'une prothèse en ePTFE de 4 mm de diamètre. Dans un modèle de shunt artérioveineux fémoral chez le babouin (Figure 9), ces auteurs ont démontré une réduction majeure de l'adhésion plaquettaire (4).



Figure 9 : Modèle de shunt artérioveineux chez le Babouin (A gauche). A droite : Nombre de plaquettes déposées par unité de surface des greffons en PET (N=6) sur une période d'une heure. (4)

Yoneyama et coll. (84) ont combiné un polymère phospholipidique de 2-méthacryloyloxyéthyl phosphorylcholine avec un polyuréthane pour réaliser une prothèse vasculaire de 2 mm de diamètre. Dans une expérience utilisant cette prothèse sur des artères carotides de lapin, les auteurs, 8 jours après l'implantation, n'ont pas observé de thrombus ni de formation de néointima. Chen et coll.(85) ont obtenu des résultats similaires dans un modèle canin. Les études préliminaires chez l'homme utilisant des prothèses couvertes de phosphorylcholine ont montré des résultats cliniques acceptables, mais des études prospectives randomisées n'ont pas réussi à confirmer de bénéfice lié à l'utilisation du seul revêtement par phosphorylcholine (86).

2.3.2.5 Revêtement en poly-1,8-octanediol citrate

Yang et coll. (87) ont recouvert d'un élastomère biodégradable, le poly-1,8-octanediol citrate (POC), la surface endoluminale de prothèses vasculaires en ePTFE. *In vitro*, ce procédé a permis d'aboutir à un retard de coagulation du plasma sanguin par comparaison au groupe contrôle. De plus, les prothèses en ePTFE recouvertes de POC ont démontré *in vitro* des facultés à fixer et à promouvoir la prolifération de cellules dérivées sanguines mimant des cellules endothéliales d'origine porcine. Ce qui pourrait dans l'éventualité d'une application clinique être bénéfique pour la régénérescence endothéliale.

2.3.3 Les revêtements protéiques

La fixation de protéines aux prothèses est une autre option pour diminuer la thrombogénicité et/ou l'hyperplasie myointimale. Il n'y a malheureusement pas beaucoup d'évaluations cliniques dans ce cadre (2). Certains revêtements protéiques, comme mentionné antérieurement, ont aussi été mis à contribution par l'inclusion dans leur matrice d'agents antibactériens divers (antibiotiques, antiseptiques ou autres) en vue de diminuer la susceptibilité à l'infection des prothèses vasculaires (37-41).

2.3.3.1 Revêtement par l'albumine

L'albumine entraîne moins d'adhésion plaquettaire que les autres protéines plasmatiques comme le fibrinogène et les gammaglobulines (88). Les prothèses en PET recouvertes d'albumine ont montré *in vitro* des réductions significatives de l'agrégation plaquettaire, de l'adhésion leucocytaire et de la production de fibrine (89). Cependant, les résultats *in vivo* et les études cliniques sont restés contradictoires (2).

2.3.3.2 Revêtement par un polymère d'élastine

L'élastine est une protéine structurelle du mur vasculaire, déclenchant adhésion et agrégation plaquettaire minimales. Les expériences *in vitro* ont montré que les prothèses en PET recouvertes d'un polymère de l'alpha élastine dérivée des tissus vivants pouvaient inhiber la migration des cellules musculaires lisses sans altérer la motilité des cellules endothéliales (90). *In vivo*, des prothèses en ePTFE recouvertes de polymères protéiques recombinants mimant l'élastine ont montré une réduction de la thrombogénicité du matériau dans un modèle de circuit vasculaire *ex-vivo* chez le primate (4). Aucune étude humaine n'est disponible à l'heure actuelle (2).

2.3.3.3 Revêtement par le peptide P15

Le peptide P15 est un agent ligand des cellules, connu maintenant comme étant le domaine de l'adhésion cellulaire au niveau du collagène de type I. Il a été postulé qu'un revêtement prothétique de surface par P15 pourrait promouvoir l'adhésion des cellules endothéliales et contribuer à générer une prothèse biomimétique. Le concept a été testé *in vivo*. Des prothèses recouvertes de P15 ont été évaluées dans un modèle complexe de shunt artério-veineux chez le mouton en ayant recours à deux prothèses en ePTFE, l'une recouverte de P15 et l'autre non. Après le sacrifice des animaux, la prothèse recouverte de P15 a montré une meilleure endothélisation et un plus faible degré d'hyperplasie myointimale au niveau des anastomoses veineuses comparée au témoin (91).

2.3.3.4 Revêtement par les anticorps anti-CD34

Le CD34 est un antigène normalement exprimé à la surface des cellules endothéliales. Une étude *in vivo* utilisant des stents recouverts d'anticorps anti-CD34 (Figure 10) a montré une captation et une fixation plus importantes des progéniteurs endothéliaux circulants en présence de l'anticorps (92). Rotmans et coll.(93) rapportent des résultats similaires en évaluant des prothèses en ePTFE recouvertes d'anticorps anti-CD34. Dans cette étude, les auteurs ont observé à 72 heures une augmentation de l'endothélisation des prothèses ePTFE implantées (Figure 11). En revanche, l'hyperplasie myointimale s'était toujours développée aux dépens des anastomoses distales. Ce procédé pourrait paraître séduisant, si les résultats se confirmaient à l'avenir chez l'humain, en vue d'une association par exemple avec les agents antimitotiques actuels capables d'une inhibition non sélective de la prolifération des cellules musculaires lisses.

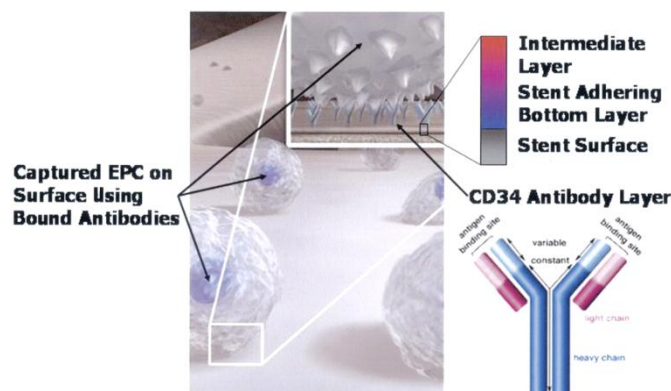


Figure 10 : Technologie de captation de cellules progénitrices endothéliales via des anticorps anti-CD34 (92)

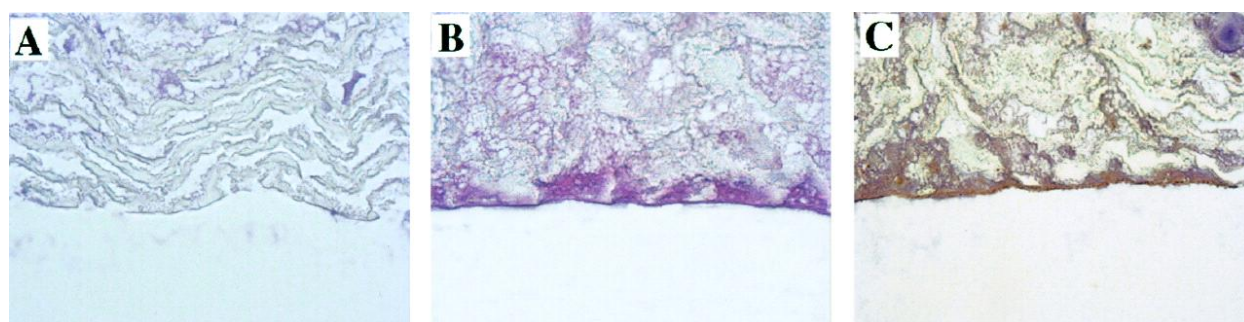


Figure 11 : Comparaison histologique des prothèses ePTFE nues (A) versus des prothèses revêtues d'anticorps anti-CD34 (B) après coloration à l'hématoxyline éosine 72 heures après implantation dans un modèle porcin de pontage artério-veineux en ePTFE (93)

2.3.3.5 Revêtement par le peptide Arg-Gly-Asp cyclique liant les intégrines

Des stents actifs recouverts avec la séquence Arg-Gly-Asp cyclique liant les intégrines ont montré une diminution de l'hyperplasie myointimale par recrutement de progéniteurs endothéliaux (94). L'application de ce recouvrement aux prothèses vasculaires ou à des stents de calibre plus large n'a pas encore été évaluée.

2.3.3.6 PTFE modifié avec le facteur de croissance fibroblastique

Greisler et coll. (95) ont prétraité des prothèses en ePTFE avec un mélange de colle de fibrine et de facteur de croissance fibroblastique-1 marqué à l'iode 125, le tout associé à de l'héparine en utilisant une technique de perfusion sous pression. L'utilisation de ces prothèses prétraitées dans un modèle canin de pontage aorto-iliaque ou thoraco-abdominal semble montrer une meilleure endothélisation par comparaison aux prothèses standard.

2.3.4 Revêtement cellulaire des prothèses vasculaires et ingénierie tissulaire

2.3.4.1 Le revêtement par les cellules endothéliales ou par les cellules souches

Les cellules endothéliales sécrètent plusieurs substances capables d'inhiber la thrombose et l'hyperplasie myointimale. Plusieurs groupes ont rapporté des résultats expérimentaux impressionnants en utilisant des prothèses vasculairesensemencées de cellules endothéliales (96-98). D'autres investigateurs ont plus récemment utilisé des progéniteurs endothéliaux circulants isolés à partir du sang périphérique ou de la moelle osseuse en vue de cet ensemencement. Fujita et coll. (99) ont ainsi ensemencé des prothèses en PET de 4 mm de diamètre avec des cellules souches résultant d'un prélèvement sanguin pré coagulé de moelle osseuse. Les prothèses ainsi modifiées furent évaluées dans un modèle canin de pontage carotidien. Au bout de la quatrième semaine après l'implantation, les prothèses traitées montraient une couverture de 80% de cellules endothéliiformes alors que les prothèses témoins n'en étaient pas recouvertes. L'ensemencement prothétique par cellules endothéliales ou par leurs cellules progénitrices comporte plusieurs limitations pour une application à grande échelle, notamment le coût, la laboriosité du processus, le délai de plusieurs semaines de réalisation et le risque infectieux. De plus, les questions sur la velléité des cellules implantées à conserver leurs fonctions endothéliales effectives demeurent pendantes. La probabilité d'une transformation en fibroblastes, en cellules musculaires lisses ou en myofibroblastes ne peut être actuellement exclue par les données disponibles (8). Bien qu'en soi le concept reste attractif, une des autres difficultés majeures réside dans la capacité réelle à réaliser l'attachement des cellules sur un substrat prothétique constamment soumis au passage du flux sanguin. L'obtention de quantités importantes de cellules nécessaires pour l'ensemencement est aussi problématique (8). Des méthodes visant à améliorer la durabilité de la fixation des cellules et à optimiser les cultures restent encore de nos jours des sujets majeurs d'investigation expérimentale.

2.3.4.2 Le revêtement par des cellules mésenchymateuses génétiquement modifiées (Prothèses biohybrides)

L'utilisation de prothèses vasculaires à surface endoluminale colonisée par des cellules souches mésenchymateuses d'origine médullaire et génétiquement modifiées (CSMs) a été récemment publiée (7, 100). Ces CSMs surexpriment le gène de l'enzyme (*eNOS* :

endothelial Nitric Oxide Synthase) responsable de la synthèse de l'oxide nitrique endothéliale (Figure 12). L'objectif est d'obtenir avec ces prothèses biohybrides l'association des propriétés du NO produit en plus grande quantité *in situ* aux effets angiogéniques des CSMs sur le lit artériel natif (7, 100). Etant donné que le NO a des effets vasodilatateurs, ces prothèses pourraient aussi améliorer le débit sanguin périphérique d'aval. Ce qui résulterait probablement en une augmentation de la perméabilité au long cours des pontages prothétiques (100). Une autre application intéressante anticipée serait l'implantation d'endoprothèses ou de prothèses ainsi modifiées au niveau de la circulation artérielle pulmonaire chez les patients souffrant d'hypertension artérielle pulmonaire sévère (7).

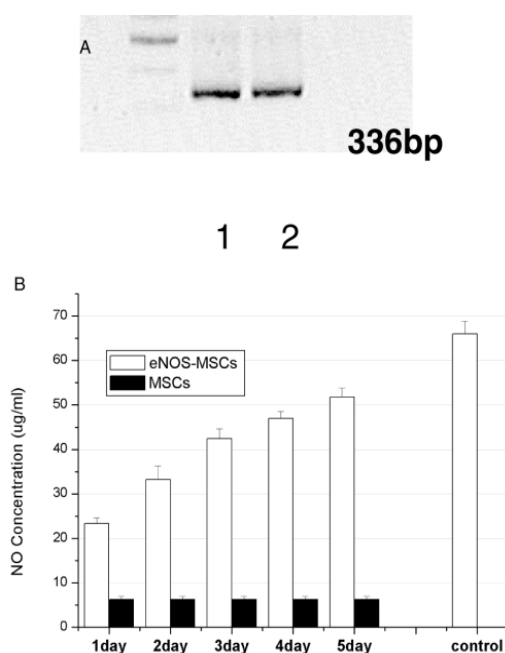


Figure 12 : Expression du transgène de l'ARNm détectée par RT-PCR sur de l'ARN isolé de prothèses vasculaires ensemencées de cellules souches mésenchymateuses (MSCs) génétiquement modifiées surexprimant l'eNOS (eNOS-MSCs). Les eNOS-MSCs produisent significativement une quantité plus importante de NO (100)

Malgré les avantages théoriques évidents de ces prothèses biohybrides, par exemple pour la conception de substituts vasculaires de petits diamètres (< 6 mm), plusieurs problèmes restent néanmoins à résoudre. Elles n'ont pas notamment encore été testées sur des modèles animaux en condition de flux sanguin pour être exposées au « *shear stress* » dont les effets sur la stabilité et la survie de ces CSMs restent inconnus. De plus, l'expression du gène qui est médiée par l'adénovirus est connue pour persister seulement deux semaines, délai qui pourrait être insuffisant pour des applications cliniques (2)

2.3.4.3 Le revêtement par des nanofibres

Le but de la construction de prothèses vasculaires non thrombogéniques dérivées de l'ingénierie tissulaire est de produire des prothèses avec des taux de perméabilité à long terme élevés (8, 72). Les difficultés pour arriver à cet objectif incluent comme écrit plus haut le développement de scaffolds (littéralement : échafaudage) servant de structure architecturale à la construction cellulaire ainsi que la constitution de sources importantes de cellules. Hashi et coll. (101) ont utilisé la technologie d'électrofilage pour générer des scaffolds nanofibreux faits de polymères de synthèse ou de molécules de matrice native. Ces auteurs ont utilisé des scaffolds nanofibreux biodégradables composés de nanofibres alignées pour mimer les fibrilles de collagène natives, l'objectif étant de guider l'organisation des cellules souches mésenchymateuses médullaires dans une prothèse vasculaire de petit diamètre.

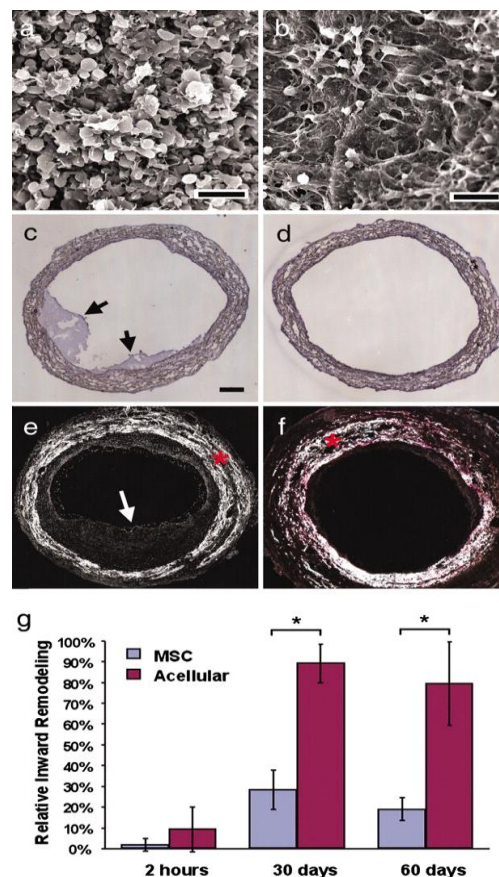


Figure 13 : Propriétés antithrombotiques *in vivo* des cellules souches mésenchymateuses (MSC). (a & b) Caractérisation en microscopie électronique de la surface luminale des prothèses acellulaires (a) et des prothèsesensemencées de MSC (b) qui ont été implantées pendant 2 h (échelle a-b : 5 µm). (c & d) Coloration à l'H&E d'une coupe de prothèse vasculaire acellulaire (c) et d'une prothèseensemencée par des MSC (d) qui ont été implantées pendant 2 heures. Les flèches indiquent le thrombus à la surface luminale (échelle c-f : 100 µm). (e & f) Rapport thrombus/intima (Flèches) en microscopie polarisée au niveau des coupes d'une prothèse vasculaire acellulaire (e) vs une prothèseensemencée de MSC (f) implantées depuis 60 jours. (g) Analyse statistique du remodelage intimal au niveau des prothèses acellulaires et des prothèsesensemencées de MSC. Le pourcentage de lumière vasculaire occluse était quantifié sur l'observation au microscope polarisé. $P < 0.001$, $n = 3$. (101)

Les données expérimentales rapportées par Hashi et coll. (101) montrent que les nanotechnologies pourraient permettre une infiltration efficace par les cellules vasculaires et un remodelage effectif de la matrice au niveau des pontages artériels expérimentaux. Les prothèses acellulaires (sans CSMs) avaient une épaisseur intimale significativement plus importante (Figure 13). Les prothèses cellulaires (avec CSMs), montraient d'excellents résultats de perméabilité à long terme et affichaient des couches organisées de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses comparables aux artères natives (Figure 13). De façon similaire, les résultats à court terme montraient que les scaffolds nanofibreux acellulaires provoquaient l'adhésion plaquettaire et la formation de thrombus. Ce qui disparaissait avec l'ensemencement de ces scaffolds par des cellules souches mésenchymateuses. De plus, les CSMs agissaient *in vitro* comme les cellules endothéliales en résistant à l'adhésion plaquettaire dépendant des protéoglycans. Ces résultats préliminaires encourageants mettent en lumière le rôle potentiel des scaffolds nanofibreux recouverts de cellules comme substrat pour la fabrication de prothèses vasculaires de petit calibre. Des préoccupations importantes persistent cependant concernant le comportement des CSMs génétiquement modifiées chez l'homme (2).

2.3.5 Les systèmes d'immobilisation et de libération de médicaments

Les systèmes implantés dans le réseau artériel sont potentiellement des systèmes idéaux de libération de médicaments. La libération d'agents thérapeutiques directement au contact des tissus malades permettrait leur administration sélective à l'endroit où précisément leur action serait la plus attendue. L'efficacité pourrait ainsi être augmentée tout en limitant les pertes et la toxicité inhérentes à l'administration systémique de ces agents (2). A côté des antibiotiques ou des antiseptiques qui peuvent être libérés plus ou moins rapidement au fil de la dégradation du polymère de revêtement d'étanchéité des prothèses vasculaires, différentes classes moléculaires ont été évaluées dans cette optique.

2.3.5.1 Molécules anticoagulantes

L'héparine a été immobilisée par interactions électrostatiques, via ses groupements sulfates chargés négativement, avec des surfaces de prothèse vasculaire positivement chargées (16). Alternativement, l'héparine a été incorporée dans des hydrogels ou dans des matrices polymères enrobant les prothèses ou les stents vasculaires en vue d'une libération *in situ* au fil de la dégradation du polymère dans l'organisme (102, 103). L'immobilisation de

l'héparine peut être réalisée aussi par liaison covalente au moyen d'un bras espaceur (« *spacer* ») (16). D'autres ont utilisé la modification de surface Carmeda BioActive (liaison covalente) pour immobiliser directement l'héparine sur des surfaces en ePTFE (104, 105) et améliorer ainsi la perméabilité des prothèses vasculaires (106). Le procédé Carmeda BioActive dit technique d'immobilisation en « *end-point* » consiste à dépolymériser l'extrémité réductrice de la chaîne linéaire de l'héparine pour former un groupe aldéhyde pouvant être conjugué par une amine primaire à la surface de la prothèse ou du stent vasculaire fonctionnalisé. Bosiers et al. ont rapporté des résultats initiaux prometteurs lors de séries cliniques utilisant ce genre de prothèses modifiées (107). Une étude clinique prospective randomisée chez 569 malades publiée récemment a montré une réduction significative de 50% du risque d'échec d'un pontage fémoro-poplité quand il était réalisé avec du ePTFE fonctionnalisé à l'héparine (Propaten[®], W. L. Gore & Associates, Flagstaff, Arizona, USA) comparé au ePTFE standard (108). Il persiste cependant un risque théorique, et potentiellement fatal, de thrombopénie induite à l'héparine (TIH) chez des malades à risque dont la susceptibilité aux TIH n'est pas forcément avérée en préopératoire. Tseng et coll. (109) ont réussi à immobiliser la thrombomoduline (une protéine anticoagulante) associée à l'héparine sur la surface d'un film. Ils ont été capables de démontrer une inhibition significative de l'activité de la thrombine en utilisant un circuit de flux continu. Wyers et coll. (110) ont lié l'hirudine (un inhibiteur direct de la thrombine) au polymère de revêtement (à base d'albumine) de patchs prothétiques en PET. Dans un modèle canin, des patchs ainsi traités, exposés à du sang non héparinisé pendant deux heures, ont montré comparés au témoin une réduction de la formation de thrombus macroscopique et du développement de pseudo-intima. L'hirudine a aussi été liée au polyuréthane carboxylé et a montré des propriétés anti-thrombine *in vitro* (111). Aucune étude *in vivo* utilisant l'hirudine liée au polyuréthane n'a été conduite à ce jour (2).

2.3.5.2 Les agents thrombolytiques

L'activateur tissulaire du plasminogène (TPA) est un agent puissant qui dégrade les complexes de fibrine et produit une thrombolyse. Il est largement utilisé en clinique sous forme de perfusions *in situ* pour traiter les thromboses de prothèse vasculaire (2). Une étude animale notamment a porté sur les prothèses modifiées par addition de TPA associé à un analogue synthétique de prostaglandine (l'ilomédine ou Iloprost[®]). Greco et coll. ont remplacé des aortes de rats par des prothèses en ePTFE de 1 mm de diamètre (112). Ils ont observé que, 90% des prothèses modifiées restaient perméables, une semaine après

l'implantation, par comparaison à 60% de cas de thrombose observés dans le groupe témoin (112).

2.3.5.3 Les agents antiagrégants plaquettaires

L'ilomédine (Iloprost®) est un analogue de synthèse des prostaglandines. Il inhibe l'agrégation plaquettaire et favorise la vasodilatation. Il a été utilisé en association avec l'hirudine pour modifier des prothèses en PTFE de 4 mm de diamètre (113). La plateforme de libération était constituée de polyéthylène glycol (PEG) ayant permis une libération lente et continue pendant plusieurs semaines.

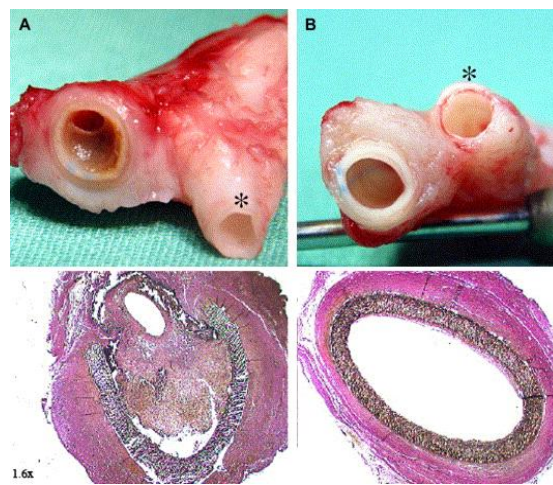


Figure 14 : Histologie de l'anastomose distale des prothèses vasculaires en ePTFE non-revêtues (A) versus revêtues (B) d'un polymère de PEG intégrant une association hirudine-iloprost. A noter la sévère hyperplasie myointimale sur les prothèses témoins comparée aux prothèses enrobées. (113)

L'expérimentation animale a montré (Figure 14), avec 6 semaines de recul, une réduction significative de l'hyperplasie myointimale en comparaison au groupe témoin qui présentait des flux très réduits et des sténoses anastomotiques plus sévères (113). Aldenhoff et coll.(114) ont lié le dipyridamole à des surfaces de polyuréthane en utilisant un agent espacer « spacer » hydrophile. Ils ont été capables de démontrer une réduction de l'adhésion plaquettaire *in vitro* ainsi qu'une amélioration de la perméabilité prothétique, sur un modèle animal caprin (2).

2.3.5.4 Les agents anti-mitotiques

Les stents recouverts de sirolimus ou de paclitaxel ont été utilisés avec succès en cardiologie interventionnelle pour réduire l'incidence des resténoses. Cagiannos et coll. (115) ainsi que Lee et coll. (116) ont utilisé respectivement du sirolimus et du paclitaxel pour recouvrir des prothèses vasculaires avant implantation chez l'animal. Ces deux groupes d'auteurs ont observé une différence statistiquement significative sur le critère de la sténose anastomotique

en faveur des prothèses traitées par rapport aux prothèses standard (2). Le Tableau 2 présente le grade histologique rapporté par Cagiannos et coll. (115) dans les deux groupes, à noter l'absence de différence sur la prolifération endothéliale mais une inhibition significative de la colonisation par des cellules fusiformes (musculaires lisses) au niveau des anastomoses des prothèses traitées avec de la rapamycine.

Tableau 2 : Grade histologique de l'hyperplasie myointimale au niveau des anastomoses (115)

Variable	ePTFE standard N=12	ePTFE enrobé rapamycin N=10	P
Formation de néointima	2.5 ± 0.2	0.8 ± 0.2	<0.0001
Colonisation par des cellules fusiformes	2.3 ± 0.3	0.8 ± 0.2	0.0007
Endothélisation	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	1

2.4 Limitations des systèmes inventoriés pour améliorer les matériaux prothétiques vasculaires

Jusqu'à date les systèmes expérimentés pour améliorer les propriétés biologiques des prothèses vasculaires n'ont pas abouti à une application clinique efficace. L'analyse de la littérature que nous avons réalisée montre que des efforts importants ont été effectués pour développer l'immobilisation d'agents pharmaceutiques ou des systèmes de libération de principes actifs utilisant comme vecteur les prothèses vasculaires. Certains systèmes actifs *in vitro* ou même *in vivo* ne font pas la preuve de leur efficacité lors des études cliniques. Pour beaucoup de systèmes où des résultats initiaux prometteurs étaient notés, aucune suite expérimentale n'est retrouvée dans la littérature probablement à cause de résultats subséquents décevants. La technologie applicable cliniquement qui est actuellement la plus avancée repose sur l'emprisonnement au sein du polymère d'étanchéification des prothèses vasculaires notamment des prothèses vasculaires en PET des agents antiseptiques, des agents anticoagulants ou des antibiotiques. Il est impossible de contrôler via de tels systèmes la libération des molécules thérapeutiques piégées. Cette libération peut se faire plus ou moins rapidement dans le temps en des proportions variables car dépendant du processus de dégradation du polymère et de ses affinités chimiques avec la structure moléculaire en question.

De plus, d'un point de vue uniquement conceptuel il nous est apparu, à l'analyse des différentes données rapportées dans la littérature, que le développement d'un système unique ne permettra pas de cerner l'ensemble des problèmes (thrombogénicité, susceptibilité à l'infection, hyperplasie myointimale, etc.). Ainsi, si la susceptibilité aux infections peut très bien répondre à un concept à efficacité limitée dans le temps pour la libération d'antibiotiques par exemple, un système plus pérenne semble nécessaire quand il faut s'attaquer à la thrombogénicité des biomatériaux vasculaires ou au problème de l'hyperplasie myointimale. Encore faut-il qu'un système de libération d'antibiotiques puisse offrir la possibilité de moduler le choix de la molécule thérapeutique tenant compte des germes en présence et de leur susceptibilité ou non aux agents anti-infectieux. Les cyclodextrines semblent offrir cette possibilité.

C'est dans ce contexte que nous avons développé notre projet de recherche expérimentale par la définition de deux axes principaux. Le premier axe vise l'optimisation et la finalisation du concept de libération de principes actifs notamment de divers antibiotiques via des prothèses vasculaires enrobées de cyclodextrines. Le deuxième axe porte sur le développement d'un système d'immobilisation de principes actifs à la surface de prothèses vasculaires en vue de leur conférer de manière plus pérenne des propriétés anti-thrombotiques et/ou antiprolifératives spécifiques dirigées contre les cellules musculaires lisses tout en encourageant la régénérescence endothéliale, etc.

3 BUT ET STRUCTURATION DES PRESENTS TRAVAUX

Des études réalisées antérieurement dans notre laboratoire ont permis de développer des prothèses vasculaires en polyester (PET) dotées d'un revêtement de polymère d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine capable d'adsorber puis de libérer de manière prolongée divers antibiotiques. Le but des présents travaux était de déterminer les conditions optimales pour une libération effective de trois antibiotiques à partir de ces prothèses revêtues d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine. Nous en avons testé l'efficacité dans des modèles *in vitro* et *in vivo* d'infections vasculaires. Nous avons eu recours à sept souches pathogènes parmi les plus fréquemment rencontrées dans ce contexte en pathologie humaine. Nous avons aussi évalué la possibilité d'utiliser les molécules antibactériennes en association. Les phénomènes de synergisme ou d'antagonisme produits sur le substrat prothétique devraient aussi être déterminés. L'objectif de telles expérimentations était de déterminer les conditions pour pouvoir moduler et d'adapter le traitement antibiotique délivré *in situ* en ciblant les divers pathogènes rencontrés dans le cadre d'infections mono ou polymicrobiennes. Nous avons

parallèlement évalué *in vivo* l'innocuité, la tolérance tissulaire et la biocompatibilité des prothèses fonctionnalisées par les cyclodextrines dans la perspective d'une application clinique.

L'efficacité limitée dans le temps et l'inadéquation de certains principes actifs d'intérêt à former des complexes d'inclusion avec les cyclodextrines constituent à ce compte les principaux écueils. Nous avons de ce fait développé un système alternatif d'immobilisation de principes actifs sur des prothèses vasculaires en polyester dans le but de réduire leur thrombogénicité. Notre stratégie a consisté à soumettre la prothèse à un traitement par plasma froid suivi d'un greffage de l'acide acrylique par copolymérisation. Les fonctions carboxyliques ainsi ajoutées ont ensuite permis la fixation directe ou via un agent espaceur d'une molécule bioactive d'intérêt comme la simvastatine, l'héparine ou la molécule EP224283 un agent inhibiteur du facteur Xa couplé d'un antagoniste de la glycoprotéine IIb/IIIa. L'étude extensive des paramètres réactionnels nous a permis de déterminer les conditions optimales de traitement par plasma froid, de la polymérisation greffante par l'acide acrylique et de la fixation des différents principes actifs. Les tests biologiques de coagulation sanguine, d'adhésion plaquettaire, d'agrégation plaquettaire, d'hémolyse et de prolifération de cellules endothéliales et musculaires lisses, ont été réalisés sur les prothèses vasculaires ainsi modifiées et sur des prothèses témoins appropriées.

4 PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE I : Les prothèses vasculaires fonctionnalisées par un polymère d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine pour la libération contrôlée et prolongée de principes actifs.

4.1 Généralités sur la fonctionnalisation des prothèses vasculaires par les cyclodextrines

4.1.1 Les cyclodextrines

Les cyclodextrines (CDs) sont une famille d'oligosaccharides issus de la dégradation enzymatique de l'amidon (117, 118). Elles forment une famille de composés basée sur trois macrocycles de base qui se différencient par leur nombre d'unités glucosidiques (118, 119). On distingue (**Figure 15**) :

1. les alpha (α)-CD composées de 6 unités glucosidiques.
2. les bêta (β)-CD composées de 7 unités glucosidiques
3. les gamma (γ)-CD composées de 8 unités glucosidiques

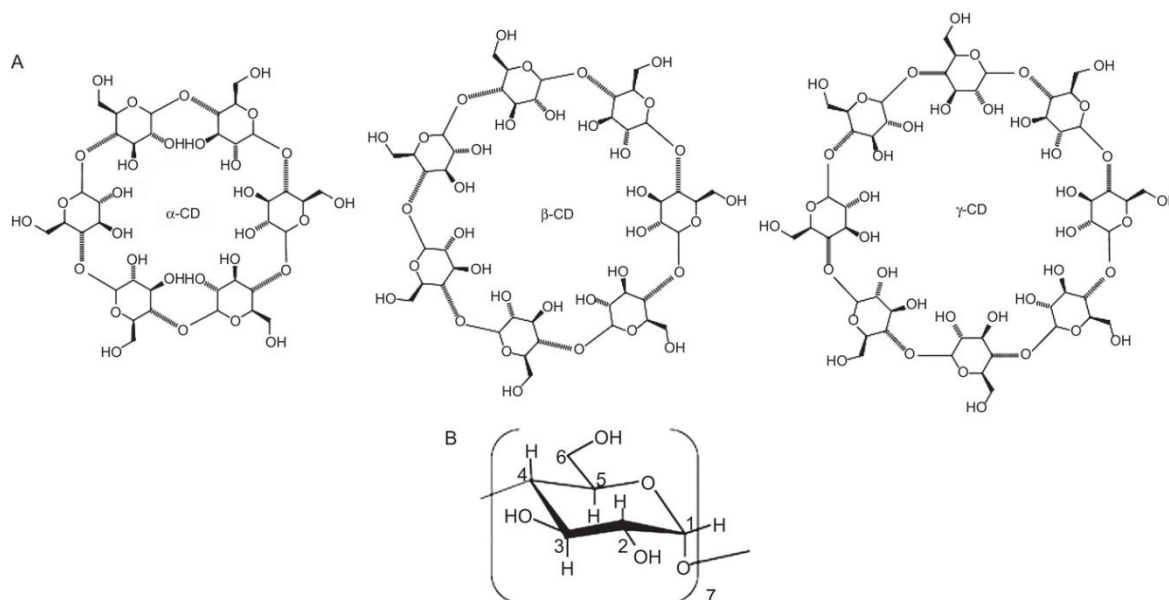


Figure 15 : Formule chimique semi développée des cyclodextrines α , β et γ . (119)

La structure tridimensionnelle des CDs configure une cage ou un anneau dont l'intérieur constitue une cavité hydrophobe et dont l'extérieur est hydrophile (120). Ces molécules cages sont capables de former des complexes d'inclusion (relation hôte—invitée) ou des complexes

supramoléculaires réversibles (Figure 16) avec un grand nombre de molécules organiques (121, 122)

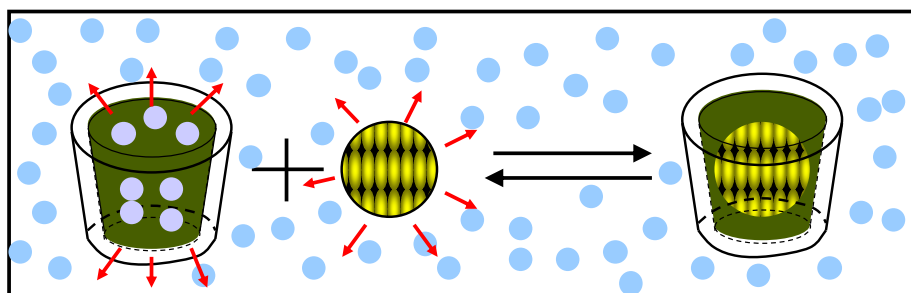


Figure 16 : Schématisation de la formation d'un complexe d'inclusion ou relation hôte—invitée ou encore assemblage supramoléculaire à partir des cyclodextrines.

Plusieurs procédés industriels en vigueur dans les domaines textile, sanitaire, agroalimentaire, cosmétique, ou pharmacologique se basent sur cette faculté des CDs à établir cette relation hôte—invitée réversible avec des molécules d'intérêt. Les propriétés physico-chimiques ou biologiques de nombre de produits industriels se trouvent ainsi améliorées. Les CDs sont par exemple intégrées dans la composition des parfums en vue de diminuer leur volatilité, d'améliorer l'hydro solubilité de composés lipophiles, et d'augmenter la stabilité de molécules sensibles à une dégradation chimique ou photochimique (119).

Les CDs « natives » peuvent être chimiquement modifiées par substitution de leurs fonctions hydroxyles primaires et/ou secondaires conduisant aux CDs modifiées ou dérivés des CDs. Un grand nombre de dérivés de CDs ont été de la sorte synthétisés : 2-hydroxypropyl- β -CD (123), méthyl- β -CD (124) et des dérivés sulfatés amphiphiliques α -, β - et γ -Cds (125). Parmi les dérivés de CDs, l'hydroxypropyl cyclodextrine est celui qui est le plus utilisé et produit à grande échelle. Ce dérivé a subi une substitution plus ou moins complète de ses fonctions hydroxyles primaires et/ou secondaires (Figure 17) par le groupe 2-hydroxypropyl (123).

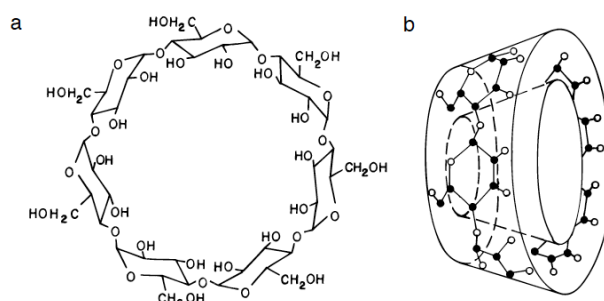


Figure 17 : (a) Formule chimique semi développée de la Hydroxypropyl- β -CD. (b) Schématisation de sa configuration tridimensionnelle. (120)

La littérature fourmille de références où les CDs sont utilisées pour améliorer la biodisponibilité de principes actifs (126) notamment ceux administrés par voie orale (127), oculaire (128), intrarectale (129, 130) ou trans-dermique (129). Les CDs ont été incorporées avec succès dans des liposomes, des microcapsules ou des nanoparticules (131-133). Des réserves avaient été émises initialement sur l'administration intraveineuse des CDs natives du fait de leur néphrotoxicité potentielle (134, 135). Plusieurs études ont depuis démontré l'innocuité de certaines formes chimiquement modifiées de CDs même administrées par voie intraveineuse (123). L'hydroxypropyl- β -cyclodextrine et l'hydroxypropyl- γ -cyclodextrine ont en particulier démontré des propriétés pharmacologiques intéressantes et sont rentrées depuis dans la composition de nombre de médicaments destinés à une administration intraveineuse (136). Ces dérivés hydroxypropylés ont été utilisés avec succès comme « drug delivery systems » pour la libération contrôlée et ciblée de nombre de médicaments (137, 138).

Des travaux antérieurs réalisés au sein de notre laboratoire de recherches INSERM U1008 conjointement avec l'unité du CNRS U8207 des Matériaux et Transformations (UMET, équipe Ingénierie des systèmes polymères)) ont permis de développer et de breveter la fonctionnalisation des biomatériaux textiles vasculaires en PET par les CDs (PCT/FR00/00378, EP 1165621 (2000) ; US 6, 660,804 B1 (2003)).

4.1.2 Le concept du PET fonctionnalisé par un polymère de cyclodextrines

Le concept (Figure 18) développé consiste à fonctionnaliser les fils de prothèses vasculaires en PET par l'adjonction d'un polymère d'hydroxypropyl-cyclodextrine. Le procédé consiste en une réaction de polyestérification utilisant l'hydroxypropyl-cyclodextrine, un catalyseur et les fonctions carboxyliques de l'acide citrique (CTR) comme agent réticulant (26). Le polymère formé autour des fils du PET pourra ensuite être chargé extemporanément par un agent thérapeutique (principe actif) pour rendre la prothèse bioactive. Une fois la prothèse implantée, le principe actif est libéré progressivement (26).

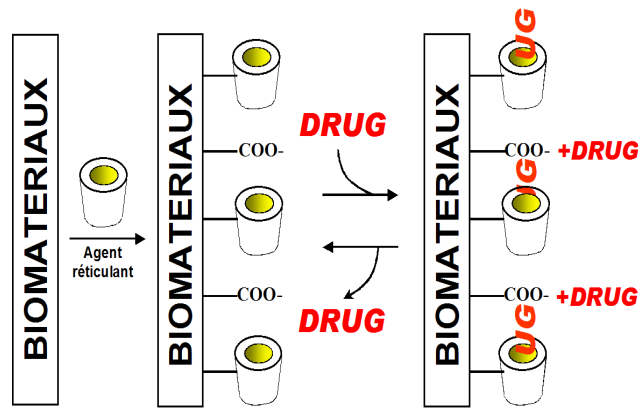


Figure 18 : Concept de fonctionnalisation d'un biomatériau par la CD pour la délivrance d'un médicament (DRUG)

Dans le cadre du traitement ou de la prévention des infections de prothèse vasculaire (IPV) par exemple, les agents thérapeutiques peuvent être des antibiotiques (seuls ou combinés) ou des antifongiques adaptés. Ces agents pourront ainsi être libérés par le dispositif (prothèse ou endoprothèse) à des concentrations plusieurs fois multiples de la concentration minimale inhibitrice (5). L'action attendue des agents antimicrobiens libérés est d'inhiber la croissance et la prolifération des microorganismes au contact de la prothèse.

4.1.3 Résumé des travaux antérieurs du groupe sur le concept

4.1.3.1 Développement et optimisation du procédé de fonctionnalisation des prothèses en PET par les cyclodextrines

Des travaux préliminaires ont été réalisés en vue d'optimiser le concept. L'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HP β CD) a été retenue pour fonctionnaliser des prothèses vasculaires en fils de PET du fait d'une meilleure hémocompatibilité comparée à l'hydroxypropyl- α -cyclodextrine ou à l'hydroxypropyl- γ -cyclodextrine (139). L'HP β CD présente de plus une réactivité supérieure. Il serait ainsi possible d'appliquer une température et une durée de thermofixation inférieures, dans des conditions relativement douces, pour préserver au maximum les propriétés mécaniques de la prothèse (140).

La caractérisation du procédé de fonctionnalisation utilisant l'HP β CD, le catalyseur et le CTR (agent réticulant) a été réalisée. Au terme du processus de fonctionnalisation, un polymère d'HP β CD réticulé par le CTR (poly-CTR-HP β CD) était formé autour des fibres du PET (Figure 19). Le poly-CTR-HP β CD adhère à la structure moléculaire du PET par interactions physiques, par liaisons hydrogène, ioniques et Van der Waals.

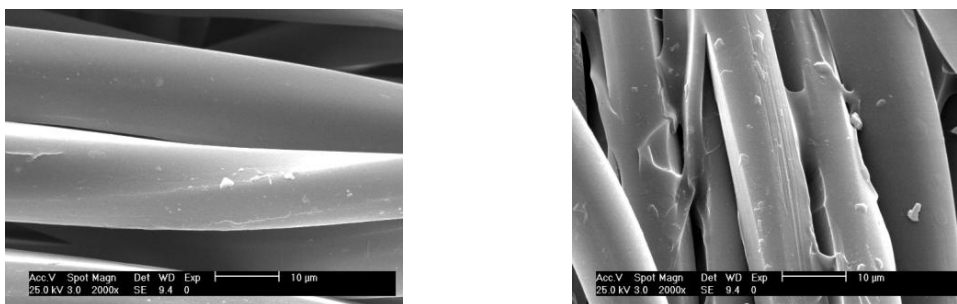


Figure 19 : Clichés au Microscope électronique à balayage des fibres de PET vierge (gauche) et de PET-Cyclodextrine (droite)

Les prothèses en PET fonctionnalisées ont été aussi trouvées, du fait de la présence du polymère, moins poreuses mais plus hydrophiles que les prothèses témoins (5, 141). De plus, la fixation du poly-CTR-HP β CD sur les prothèses n'altérerait pas leurs propriétés mécaniques (139). L'optimisation du processus en variant les conditions expérimentales a permis d'obtenir le meilleur compromis entre les propriétés d'adsorption-libération des antibiotiques et la compliance de la prothèse (24, 139).

4.1.3.2 Étude des interactions de l'HP β CD avec certains antibiotiques

Une étude en solution des interactions entre la HP β CD et différents antibiotiques: rifampicine (RFP), vancomycine (VCY) et ciprofloxacine (CFX) a été réalisée par spectrophotométrie UV-visible (142).

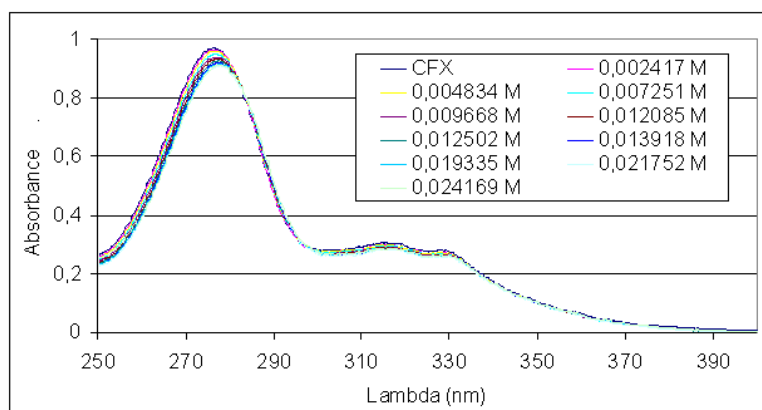


Figure 20 : Evolution du spectre d'adsorption de la ciprofloxacine (CFX) après ajout de HP β CD

La Figure 20 représente les spectres superposés de différentes solutions contenant des rapports CFX / HP β CD variant de 1/100 à 1/1000 avec une concentration de CFX fixée à $2,42 \cdot 10^{-5}$ M. La présence de points isobestiques (285 et 335 nm) observée sur les spectres (Figure 20) témoigne d'une différenciation de la CFX, présente sous sa forme « libre » ou complexée, et révèle donc le phénomène d'inclusion de cette molécule dans la cavité de la

HP β CD (143). Ces données ont été confirmées par RMN du proton et par RMN 2D qui ont de surcroît permis de modéliser la géométrie de ce complexe d'inclusion (Figure 21).

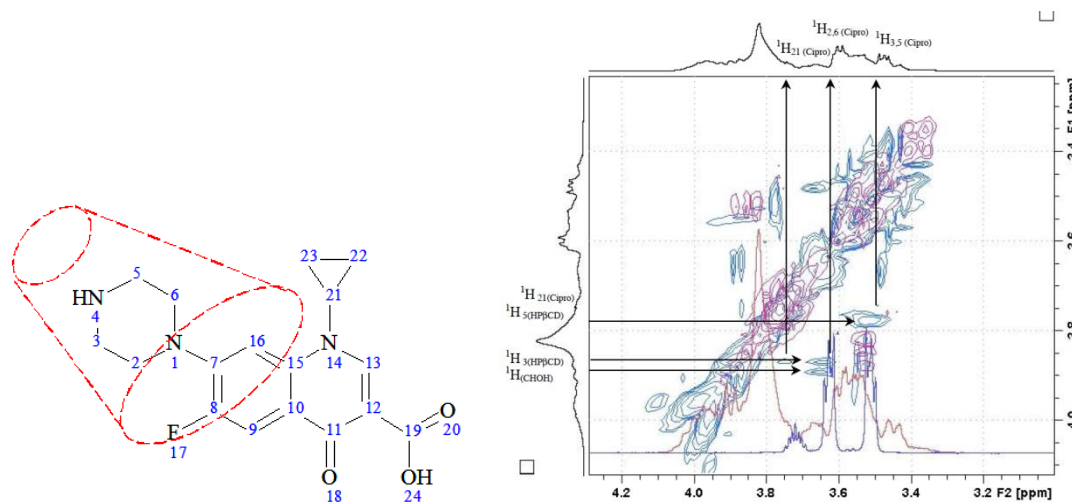


Figure 21 : Géométrie de l'encapsulation du cycle piperazinyll de la ciprofloxacine dans la HP β CD (à gauche). À droite : Spectre ROESY du mélange équimolaire de ciprofloxacine (10-2 M) et de HP β CD (10-2 M) dans D₂O (taches bleues) et de la HP β CD seule (taches rouges).

En revanche, aucune de ces techniques spectroscopiques n'a pu mettre en évidence l'inclusion de la VCY dans la cavité de l'HP β CD. En effet, la structure de cet antibiotique ne porte pas de groupe à caractère hydrophobe de dimension adaptée à la cavité, contrairement à la CFX. Toutefois, les études antérieures ont montré que la VCY présentait des interactions dites « non spécifiques » avec le poly-CTR-HP β CD, par des liaisons physiques de type hydrogène, et par piégeage de la molécule dans le réseau réticulé tridimensionnel formé par le poly-CTR-HP β CD (5).

4.1.3.3 Validation du concept de libération de principes actifs à partir de prothèses vasculaires en PET fonctionnalisées par la cyclodextrine

La fonctionnalité du poly-CTR-HP β CD pour libérer des principes actifs à partir de la surface du PET a été démontrée *in vitro* (24). Des prothèses en PET fonctionnalisées par le poly-CTR-HP β CD (PLM-CD) et en PET standard (PLM) ont été imprégnées dans une solution de VCY ou de CFX à 2 g/L. La libération en milieu aqueux de chacun des antibiotiques a été évaluée quotidiennement par spectrophotométrie UV visible.

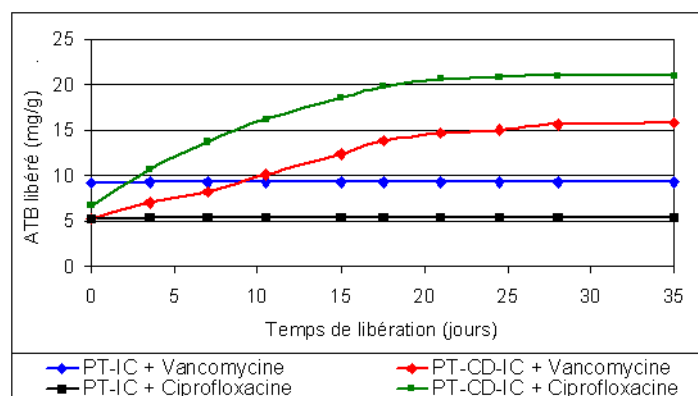


Figure 22 : Cinétique de libération de la vancomycine et de la ciprofloxacine en milieu aqueux pendant 40 jours à partir de prothèses standards (PT-IC) et de prothèses enrobées de cyclodextrines (PT-CD-IC).

La libération de la VCY et de la CFX à partir de PLM-CD était constante pendant plus de 30 jours à un taux respectivement de 0.49 mg/g/jour et de 0.64 mg/g/jour (Figure 22). A l'inverse, la PLM imprégnée dans la VCY ou dans la CFX libéra en une heure toute sa charge d'Antibiotiques (24). Cette expérience a été reconduite en milieu plasmatique humain non seulement avec la VCY et la CFX mais aussi avec la RFP. Les résultats ont confirmé l'efficacité du poly-CTR-HP β CD présent sur PLM-CD comme système de libération prolongée de ces molécules (142). Leur libération *in situ* devrait entre autres contribuer à résoudre le problème de l'inaccessibilité de certaines bactéries protégées des antibiotiques systémiques par le biofilm qu'elles constituent autour de la prothèse (5)

4.1.4 Limitations des connaissances sur le PET fonctionnalisé par poly-CTR-HP β CD

Les données précédentes ont mis en évidence que les prothèses vasculaires fonctionnalisées par les cyclodextrines permettaient effectivement de libérer des molécules bioactives et notamment des antibiotiques (CFX, RFP, VCY). Les conditions optimales de cette libération en tenant compte des contraintes spécifiques d'une application clinique en chirurgie vasculaire restèrent inconnues.

Le devenir du polymère de cyclodextrines ainsi que celui des produits de sa dégradation après implantation demeuraient l'objet de préoccupations légitimes. L'utilisation des cyclodextrines natives comme excipient de certains principes actifs administrés par voie parentérale s'accompagnait en effet de toxicité rénale ayant imposé en clinique des restrictions d'utilisation (137). En revanche, les dérivés hydroxypropylés de synthèse des cyclodextrines avaient depuis démontré une excellente innocuité ayant permis leur incorporation dans des produits destinés à une administration parentérale (138). L'HP β CD en particulier utilisée dans le procédé développé pour fonctionnaliser ces prothèses vasculaires a été étudiée de manière

extensive en ce qui a trait à son innocuité après une administration par voie parentérale. Aucun effet délétère n'a été documenté avec ce dérivé dans les différentes conditions sur la fonction rénale de l'homme ou de l'animal (123). En dépit de ces éléments, nous ne connaissons pas la toxicité, l'histocompatibilité ou les changements dans les phénomènes de cicatrisation prothétique que provoquerait le revêtement des prothèses avec le polymère d'HP β CD.

De même la question de savoir si le concept conservera son applicabilité de façon à changer de molécules pour tenir compte de l'écologie changeante des infections de prothèse vasculaire demeurerait aussi non résolue. Finalement, sans perdre de vue les problèmes éthiques à ce stade du développement d'une technologie nouvelle, la rareté relative des IPV rend impossible la réalisation d'études cliniques prospectives randomisées pour évaluer l'efficacité d'une quelconque stratégie thérapeutique par rapport à une autre (37),(41). Des modèles d'évaluation de l'efficacité *in vitro* et *in vivo* de ces prothèses vasculaires fonctionnalisées par des cyclodextrines étaient également à développer.

4.1.5 Objectifs des travaux suivants

Les résultats des études précédentes ont démontré *in vitro* la faisabilité technique et la fonctionnalité du concept de libération des principes actifs à partir de prothèses vasculaires en PET fonctionnalisées par un poly-CTR-HP β CD (poly-CTR-HP β CD). Plusieurs questions restant non résolues ont été soulevées dans le paragraphe précédent. Le but des expériences suivantes était d'élucider ces différents problèmes résiduels.

4.2 Matériels et méthodes

4.2.1 Matériels

4.2.1.1 Les prothèses vasculaires

Les prothèses vasculaires en PET étaient gracieusement fournies par Pérouse Médical (Ivry-Le-Temple, France) sous forme tubulaire et cosselée (mise en forme permettant d'éviter la plicature du greffon *in situ*). Il s'agissait de prothèses en PET tissé (Polythèse®, PLT) ou en PET tricoté (Polymaille®, PLM). Les deux formes tissée (PLT) ou tricotée (PLM) ont été utilisées au cours de ces travaux. Pour chaque expérimentation la forme utilisée a été à chaque fois précisée. Le Tableau 3 résume les spécifications techniques de ces prothèses. Ces prothèses étaient fournies comme elles sont actuellement commercialisées (PLM ou PLT) sans aucune modification expérimentale, ou après avoir suivi le processus de modification par le poly-CTR-HP β CD (PLM-CD ou PLT-CD).

Tableau 3 : Spécifications techniques des prothèses vasculaires utilisées

Prothèse	Fils (N)	Masse linéique		Densité	taux de poly- HPβCD
		Fil 1	Fil 2		
PLM	2	84 dtex	167 dtex	225 g/m ²	0%-wt
PLM-CD	2	84 dtex	167 dtex	225 g/m ²	6,7 ± 0,5%-wt
PLT	2	100 dtex	100 dtex	133 g/m ²	0%-wt
PLT-CD	2	100 dtex	100 dtex	133 g/m ²	6,7 ± 0,5%-wt

Le procédé de modification par le poly-CTR-HPβCD était réalisé industriellement mais resta conforme à la méthode développée dans nos laboratoires et exposée brièvement plus haut ou extensivement rapportée dans la littérature (27). Toutes ces prothèses étaient fournies déjà étanchéifiées au collagène sauf quand précisé. Les prothèses étaient stérilisées par rayon bêta avant d'être stockées à 15-25 °C à l'abri de la lumière et de l'humidité.

4.2.1.2 Les agents antimicrobiens

Les agents antimicrobiens utilisés au cours de ces travaux étaient fonction de la sensibilité des bactéries devant être investiguées. Ils étaient tous conditionnés suivant les recommandations des fabricants et préparés fraîchement avant le début des expériences. La rifampicine (RFP; Rifadine® 600 mg, Sanofi-Aventis) et le chlorhydrate de vancomycine (VCY; Vancomycine 500 mg, Mylan) étaient présentés sous forme lyophilisée et dilués dans de l'eau PPI à 60 g·l⁻¹ et 50 g·l⁻¹ respectivement. La ciprofloxacine (CFX; 200 mg, Bayer) était fournie déjà en solution aqueuse à 2 g·l⁻¹.

La RFP est un composé semi synthétique (Figure 23) de la famille des rifamycines-B. Ces dernières appartiennent elles-mêmes au groupe des ansamycines de type naphthalène et ont été isolées à partir de la bactérie *Nocardia mediterranei* en 1957. Parmi les composés isolés, la RFP s'avéra active contre les germes Gram positif, contre *Mycobacterium tuberculosis* et contre quelques germes Gram négatif.

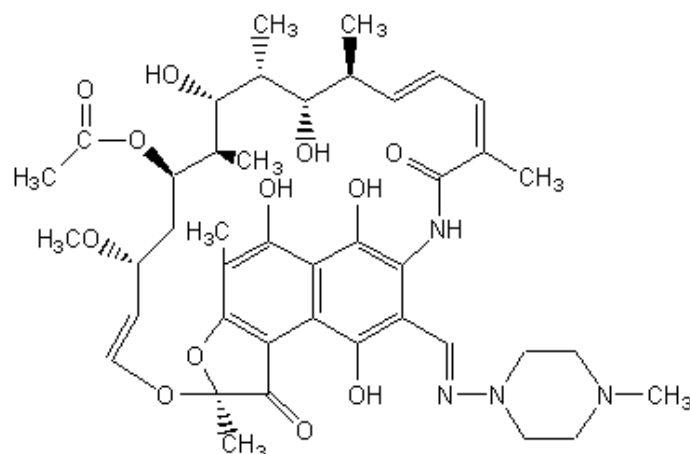


Figure 23 : Formule chimique semi-développée de la rifampicine

La CFX est un inhibiteur de la synthèse de l'ADN, qui exerce son activité essentiellement contre les bactéries Gram négatif. La CFX inhibe la sous unité A de la topoisomérase de type 2, un ADN gyrase servant à séparer l'ADN répliqué, en contrôlant le degré de surenroulement de l'ADN. Cette étape de surenroulement est indispensable aux processus de réplication bactérienne. La CFX (

Figure 24) fait partie de la famille des fluoroquinolones qui sont des antibiotiques obtenus par synthèse chimique.

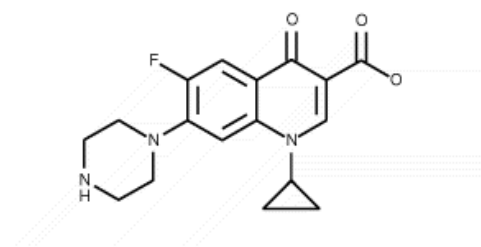


Figure 24 : Formule chimique semi-développée de la ciprofloxacine

Historiquement, des chercheurs s'étaient aperçus dès 1958 de l'activité bactéricide d'un produit secondaire obtenu lors de la synthèse de la chloroquine : la 7-chloroquinolone. Il a fallu attendre 1962 pour la mise au point de la première quinolone directement dérivée de la 7-chloroquinolone: l'acide nalidixique. Ce n'est que dans les années 1980 que virent le jour les fluoroquinolones avec l'incorporation d'un atome de fluor en position 6 et un retour au noyau de type quinoléine. Par la suite, de nombreux dérivés ont été développés dans les années 1980: La norfloxacine, la ciprofloxacine, l'ofloxacine, la péfloxacine et la loméfloxacine pour en citer quelques uns.

La VCY appartient à la famille des glycopeptides. La vancomycine (Figure 25) a été le premier glycopeptide isolé vers les années 1956 par les laboratoires pharmaceutiques américains Elli Lilly™ à partir d'échantillons de sols contenant du *Streptomyces orientalis* prélevés en Inde et en Indonésie.

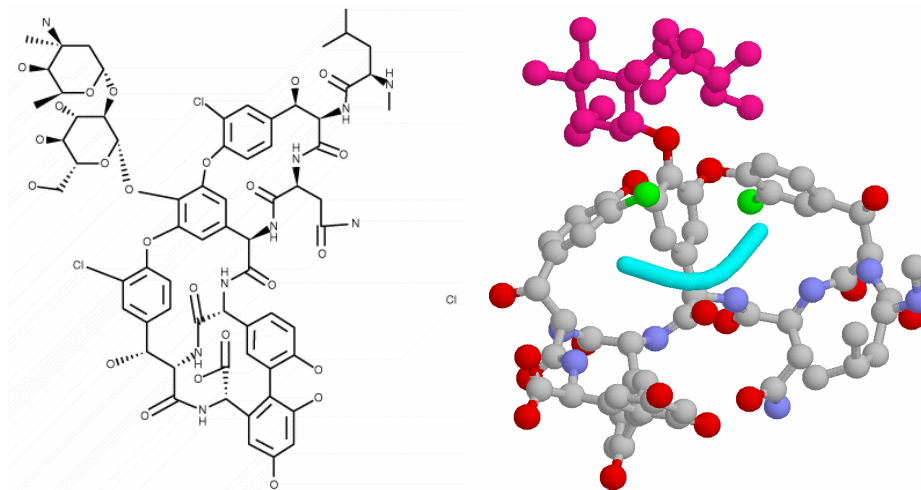


Figure 25 : Formule chimique semi-développée de la vancomycine et sa structure 3D

Les glycopeptides sont des molécules complexes, constituées d'un heptapeptide cyclique sur lequel viennent se greffer des sucres : le glucose et la vancosamine dans le cas de la VCY. La VCY présente la particularité d'exercer une activité bactéricide intense mais à début retardé contre essentiellement les Gram positifs. Caractérisée par une biodisponibilité médiocre lorsqu'elle est administrée par voie orale, la VCY n'existe sur le marché qu'en des formulations injectables. Les glycopeptides sont des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Ils agissent sur les étapes de transglycosylation et de transpeptidation nécessaire à la bonne synthèse du peptidoglycane. La principale cible d'action de la VCY est le groupement di-peptidique D-alanyl-D-alanine des précurseurs du peptidoglycane.

4.2.1.3 Les modèles animaux

Deux modèles animaux ont été mis à contribution au cours de ces travaux : un modèle murin d'implantation sous-cutanée de prothèse vasculaire et un modèle canin d'implantation prothétique en position fonctionnelle vasculaire. Tous les protocoles expérimentaux avaient reçu l'aval du comité d'éthique de l'institution d'expérimentation animale hôte. De plus, les protocoles étaient conduits en accord avec les réglementations européennes en vigueur (directive EEC 86/609). Une période d'acclimatation était observée, de 5 jours pour les souris

et de 12 jours pour les chiens, avant le début des expériences. Ces animaux étaient nourris d'une diète régulière spécifique pour rongeurs ou pour canidés respectivement.

4.2.1.3.1 Le modèle murin de contamination bactérienne intense

Des souris males (*C3H/He*) adultes, pesant 24-27 g, étaient obtenues des Laboratoires Charles River (L'Abresle, France) et hébergées à l'institut Pasteur de Lille (Lille, France) dans des conditions optimales de luminosité, de température et d'hygrométrie (cycles jour nuit de 12hrs, $22 \pm 2^\circ\text{C}$ et $45\% \pm 15\%$ d'humidité).

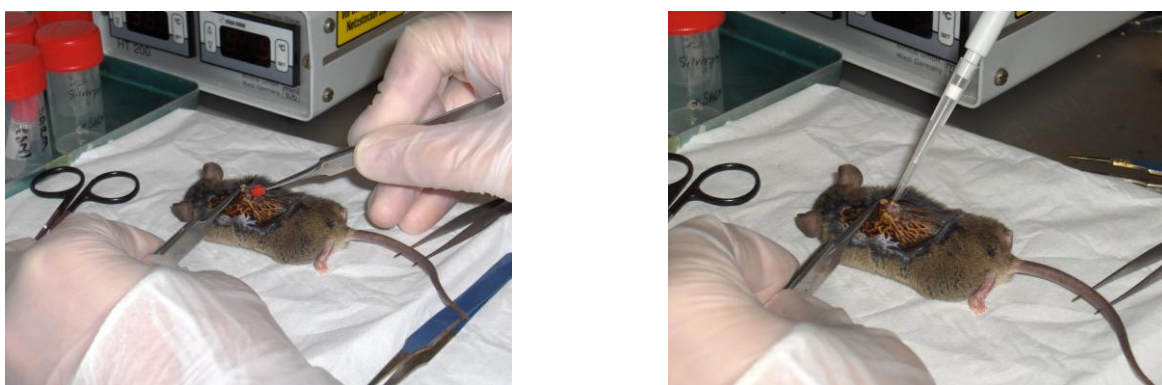


Figure 26 : Implantation d'une prothèse, en sous cutanée, chez la souris

Les animaux étaient anesthésiés en utilisant un mélange de Métédomidine (Dormitor®, 0,85mg/ml) et de Kétamine (Kétalar®, 50mg/ml) administré par voie intrapéritonéale à la dose de 10ml/kg. Après asepsie et draperie stériles, une incision de 2 cm était pratiquée selon des techniques chirurgicales standard au niveau de la région inter scapulaire (dorsale) de la souris. La confection d'un tunnel sous cutané était réalisée en effondrant le *panniculus carnosus* le long de la colonne vertébrale. Ces tunnels étaient dimensionnés pour recevoir des pastilles de 6mm de diamètre coupées à l'emporte pièce au niveau des échantillons de PLM et de PLM-CD fournis (Figure 26). Ces pastilles étaient ensuite directementensemencées peu après leur implantation par 30 μL d'un inoculum bactérien approprié de taille connue (7-8 log₁₀ UFC/ml), réalisant ainsi un modèle de contamination prothétique intense. La plaie chirurgicale était refermée sur l'échantillon contaminé à l'aide d'une agrafeuse automatique. L'Atipamezole (AntiSedan®) était utilisé au réveil pour antagoniser l'action des anesthésiants. Les souris avaient ensuite fait l'objet d'une surveillance clinique journalière à la recherche de signes locaux ou généraux d'infection avant d'être sacrifiées au septième jour post-implantation (J7) par inhalation d'une dose létale de dioxyde de carbone (CO₂).

4.2.1.3.2 Le modèle canin d'implantation prothétique en position fonctionnelle

Des chiens Mongrel (*Canis familiaris*) pesant 23 à 30 kg étaient obtenus de Marshall BioRessources (Lyon, France) puis hébergés au laboratoire Biomatech (Lyon, France). Un pontage carotidien (Figure 27) était réalisé sur chacun des chiens en implantant d'un côté une prothèse vasculaire témoin (6 mm de diamètre) et de l'autre la prothèse vasculaire à tester (6 mm de diamètre).

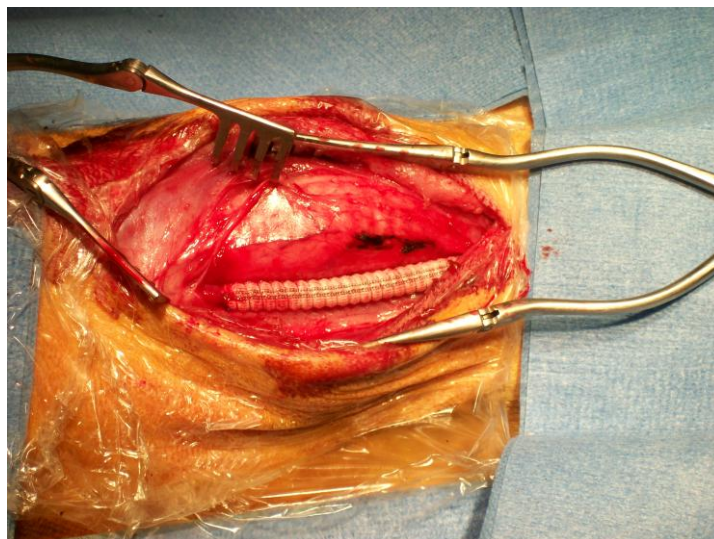


Figure 27 : Modèle canin de pontage carotidien utilisant un tube prothétique de 6mm de diamètre

Les procédures ont été réalisées sous anesthésie générale (induction: thiopental 10-15 mg/kg IM; maintien: O₂-N₂O-isoflourane 0.5-4%). Une dose unique d'héparine de 20 UI/Kg a été administrée par voie systémique. Le diamètre externe de chaque artère carotide était systématiquement noté avant les temps de clampage proximal et distal. Un segment de 3-4 cm d'artère carotide était réséqué puis remplacé par l'interposition d'un greffon prothétique en termino-terminal. L'antibioprophylaxie péri opératoire était réalisée à base de Céphalexine monohydrate (30 mg/kg/jour) et administrée lors de l'implantation et pendant les 3 premiers jours suivants. La plaie opératoire était suturée selon les techniques chirurgicales standard. L'analgésie post-opératoire était assurée par infiltration locale de Butorphanol.

4.2.2 Méthodes

4.2.2.1 Cinétique d'adsorption et de libération des agents anti-microbiens

4.2.2.1.1 Capacité d'adsorption de PLM-CD

Des échantillons tubulaires de PLM-CD et de PLM (1 cm, Ø 6 mm) ont été plongés sous agitation (200 RPM), à température ambiante dans une solution antibiotique sélectionnée

parmi la CFX, RFP et VCY de concentration définie pendant 5 à 240 minutes. Dans le but de déterminer la quantité d'antibiotiques adsorbés, une réaction d'hydrolyse du poly-CTR-HPβCD était provoquée dans la soude à 0,1N (Figure 28).

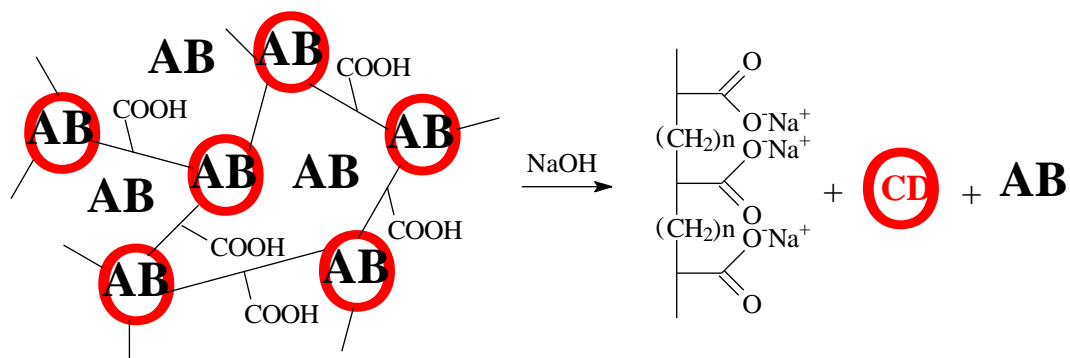


Figure 28 : Réaction d'hydrolyse du poly-CTR-HPβCD permettant la désorption quantitative de l'antibiotique préalablement adsorbé sur la prothèse PLM-CD

Brièvement, après l'étape d'imprégnation antibiotique les échantillons (n=5 par groupe et par condition expérimentale) étaient rincés 1 fois à l'eau distillée ultra pure pendant 5 minutes. Ils étaient ensuite individuellement placés dans une solution de soude (0,1N) pendant 4 heures, sous agitation (300 rpm) à 37°C de façon à hydrolyser le poly-CTR-HPβCD et libérer les antibiotiques adsorbés au substrat prothétique (Figure 28). Basée sur des courbes préliminaires de calibration, la quantification était réalisée par spectrophotométrie UV visible à 271 nm pour la CFX, à 280 nm pour la VCY et à 478 nm pour la RFP. Les résultats de cette expérience sont exprimés comme la moyenne de la quantité d'antibiotiques rapportée en mg/g de prothèse.

En faisant varier les paramètres temps d'imprégnation des échantillons PLM-CD et concentration de la solution d'imprégnation en antibiotiques, nous avons déterminé la cinétique d'adsorption et les conditions optimales d'adsorption antibiotique sur les prothèses vasculaires fonctionnalisées au poly-CTR-HPβCD.

4.2.2.1.2 Cinétique de libération en flux continu (méthode USP-IV)

4.2.2.1.2.1 La méthode USP IV

La méthode USP IV est conçue initialement pour évaluer *in vitro* la distribution de médicaments administrés par voie systémique : un liquide tampon en circulation remplaçant le milieu plasmatique et un gel placé autour du médicament représentant l'espace potentiel de diffusion. Ce modèle est constitué de 3 éléments principaux identifiés sur la Figure 29: une pompe péristaltique, un bain marie muni d'un thermostat et du circuit de circulation.

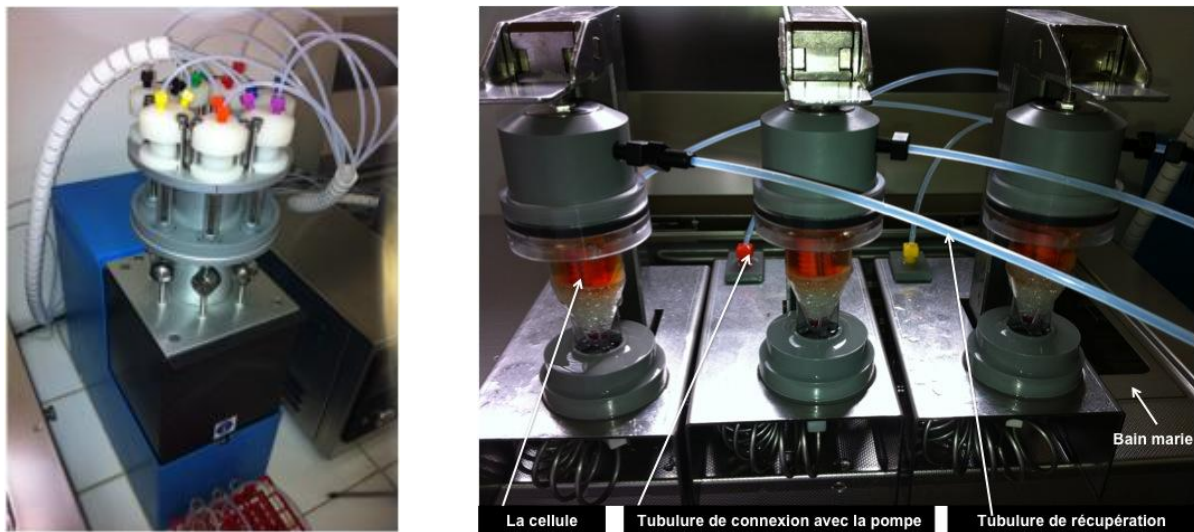


Figure 29 : USP4--- A gauche : Pompe péristaltique – A droite : circuit de circulation USP4 avec un échantillon de prothèse imprégnée de rifampicine en place

La pompe permet de délivrer dans le circuit à flux continu et à débit variable le milieu tampon choisi. Le bain marie permet de conditionner le système à une température donnée. Le circuit de distribution USP IV est composé d'une cellule reliée par des tubulures à la pompe péristaltique et au réseau de récupération du milieu en circulation (Figure 29 et Figure 30). Nous avons utilisé et adapté ce modèle afin de simuler un système de circulation à flux continu pour des prothèses vasculaires.

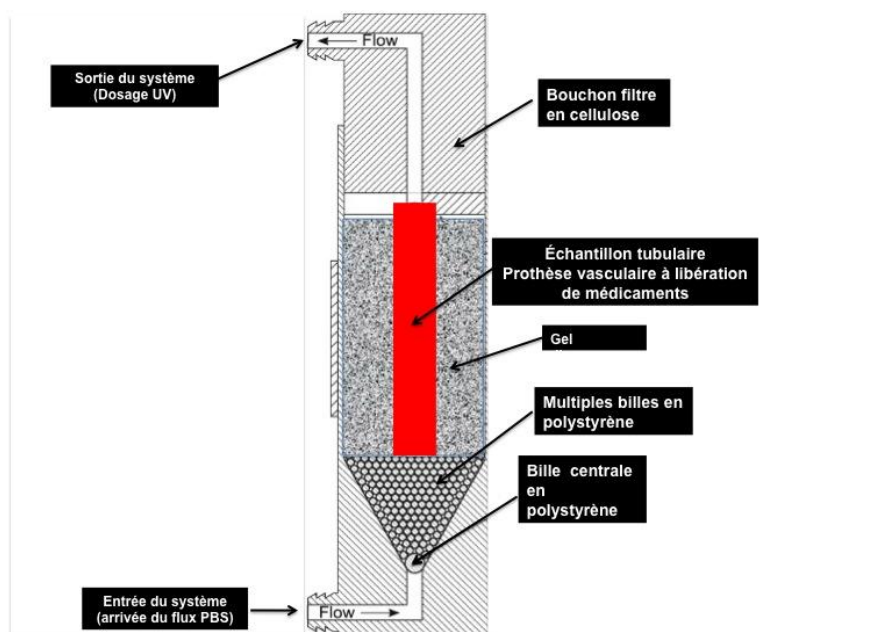


Figure 30 : Schématique de la méthode de libération en flux continu pour les prothèses vasculaires fonctionnalisées

Le montage réalisé est représenté schématiquement à la Figure 30 ; soit sur une coupe frontale virtuelle pratiquée, dans un plan tangentiel à la position de la prothèse, au niveau de la cellule de l'USP4. Cette cellule (Figure 30) plongée dans le bain marie est constituée d'une bille centrale autorisant la création d'un flux laminaire et de multiples microbilles permettant de générer un flux turbulent. Elle est dotée à sa partie supérieure d'un bouchon filtre hermétique (cellulose) doté d'un joint en caoutchouc dont le centre est perforé d'un orifice de diamètre équivalent à celui de la prothèse testée (7-10 mm). Le bouchon permet de bloquer les grosses particules et de confiner la circulation à l'intérieur de la cellule. L'échantillon prothétique à tester est placé dans la cellule au dessus des billes en polystyrène et un gel est coulé autour pour simuler la diffusion dans les tissus environnants du principe actif. Ce gel est constitué à base de 300 mg d'Agarose additionné de 50ml d'eau déminéralisée. Il est porté à 170°C et homogénéisé à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 10 minutes, avant d'être légèrement refroidi pour sa coulée autour de la prothèse. L'activation de la pompe péristaltique à débit réglé permet de faire circuler un flux continu de PBS à travers la prothèse fonctionnalisée placée dans la cellule. Le PBS est récupéré dans des tubes à essai au niveau de la tubulure de sortie (Figure 29) pour le dosage des molécules thérapeutiques délivrées éventuellement dans le milieu en circulation.

4.2.2.1.2.2 Dosage des antibiotiques libérés

Dans le but de déterminer la cinétique de libération en flux continu des antibiotiques à partir des prothèses fonctionnalisées par le poly-CTR-HP β CD, des échantillons de PLM (témoin) et de PLM-CD (test) de 3 cm de long et 10 mm de diamètre ont été imprégnés (N=3) dans des solutions antibiotiques appropriées (RFP, VCY ou CFX). Les conditions (temps, concentration) de l'imprégnation étaient celles déterminées comme optimales au cours de l'expérience précédente. Le modèle *in vitro* de cinétique de libération (méthode USP IV) était utilisé pour déterminer la quantité d'antibiotiques libérée par unité de temps dans un milieu tampon isotonique. Le tampon phosphate salin (PBS, pH 7,4, 37°C) était choisi pour ces expériences. Des échantillons tubulaires de prothèse fonctionnalisée (7-10 mm de diamètre) étaient traversés dans le modèle USP IV par un flux continu de PBS. Le flux était débité de façon continue par la pompe péristaltique à raison de 5 ml/minute et le PBS était récupéré à la sortie du système toutes les 120 secondes pendant une heure dans des tubes à essai d'une capacité de 10 ml. Basée sur des courbes préliminaires de calibration, une détermination de la quantité d'antibiotiques libérée était alors réalisée par spectrophotométrie UV visible dans le PBS. A la fin de l'expérimentation, le gel et la prothèse étaient récoltés séparément dans un

pot stérile de 120 mL pour des dosages spectrophotométriques. Une étape préalable de désorption de PLM-CD dans la soude à 0.1 N en vue d'hydrolyser le poly-CTR-HP β CD présent à la surface du PET et un passage au four à micro-ondes (10 secondes) du gel d'agarose récupéré en vue de le dissoudre à nouveau étaient respectivement nécessaires en vue de libérer l'antibiotique à doser. Pour les dosages effectués dans la soude, la longueur d'onde du spectrophotomètre était paramétrée à 271 nm pour la CFX, à 280 nm pour la VCY et à 478 nm pour la RFP. Pour les dosages effectués dans le PBS, la longueur d'ondes du spectrophotomètre était paramétrée à 270 nm pour la CFX, à 304 nm pour la VCY et à 473 nm pour la RFP. Les résultats en triplicata étaient rapportés aux poids des différents échantillons et exprimés comme une moyenne \pm écart type en mg/g.

4.2.2.2 Evaluation du temps et des produits de dégradation du poly-HP β CD

4.2.2.2.1 Dégradation in vitro en milieu salin (NaCl 0.9%)

Des prothèses PLM et PLT (20 cm, Ø20 mm) non encore étanchéifiées au collagène ont été fonctionnalisées par l'HP β CD (6,7%-wt). Les prothèses ainsi modifiées étaient déposées dans un pot stérile d'une capacité de 180 ml et contenant 150 ml de solution saline isotonique (NaCl 0,9%). La mise à l'incubation était réalisée à 37°C sous agitation à 100 RPM. Toutes les semaines, les prothèses étaient rincées à l'eau distillée pendant 15 minutes, séchées à 104°C pendant 1 heure, mises au dessiccateur pendant 15 minutes, avant d'être pesées. Les prothèses étaient alors replongées dans une solution de NaCl 0,9% fraîchement préparée. L'expérience dura ainsi 9 mois. L'étude de la cinétique de dégradation en milieu salin physiologique du revêtement d'HP β CD était faite par mesure de la perte de masse de la prothèse au cours du temps. A la fin de la période de dégradation, le milieu a été lyophilisé et la poudre résiduelle constituée de NaCl et des produits de dégradation du polyCTR-HP β CD a été analysée par spectroscopie de masse afin de détecter et d'identifier les fragments du polyCTR-HP β CD dégradé par mesure de leur pic moléculaire (ratio masse-sur-charge : m/z). Au cours de ces travaux, le spectromètre de masse utilisé (TRANSFORM®) était pourvu d'une source ionisante par nébulisation couramment nommée électro spray (ES ou ESI).

4.2.2.2.2 Dégradation in vitro dans le plasma humain

Les prothèses PLM enrobées ou non de collagène étaient découpées à l'emporte-pièce sous forme de pastilles de 10 mm de diamètre. Soixante quinze (75) pastilles de chaque gamme de prothèse (PLM-CD et PLT-CD avec ou sans collagène) étaient déposées dans un pot stérile d'une capacité de 180ml et contenant 75ml de plasma sanguin humain (Etablissements

Français du Sang, Lille). Le tout était mis à l'incubateur (37°C, humidité relative 100%) sous agitation (100 RPM). Toutes les semaines, 3 échantillons pour chaque gamme de prothèse étaient extraits du milieu plasma humain. Le milieu était ensuite renouvelé pour tous les autres échantillons en conservant le même rapport de bain : 1 ml de plasma par pastille de 10 mm de diamètre. Les échantillons prélevés étaient ensuite rincés 2 fois dans une solution d'acétonitrile (15 minutes) puis 1 fois dans une solution de PBS (15 minutes) à température ambiante afin d'enlever le maximum de résidus de plasma sanguin présents sur l'échantillon. Ce dernier était par la suite séché avant de faire l'objet d'un dosage des fonctions COOH par la méthode colorimétrique du bleu de toluidine oxydé (TBO) (144) en utilisant un spectrophotomètre UV à 634 nm.

4.2.2.3 Dégradation in vivo dans le modèle canin d'implantation prothétique

Les prothèses PLT et PLT-CD enrobées de collagène (6 mm de diamètre) étaient implantées dans le modèle canin sus rapporté et explantées au bout de 1 et 6 mois. Après explantation, des segments d'un cm (1cm) de long étaient récupérés des explants. Ces segments étaient conservés dans l'eau stérile pendant 24 heures à 4°C. Ils étaient ensuite épurés mécaniquement des tissus biologiques résiduels puis mis dans du PBS à 4°C pendant encore 24 heures. Un second nettoyage mécanique était ensuite pratiqué. De façon à ne garder que le poly-CTR-HPβCD et le PET comme sources potentielles de fonction COOH, les échantillons étaient laissés 24 heures en immersion dans une solution de SDS (enlever les tissus restants) à température ambiante, puis 4 heures à 37°C dans une solution de trypsine à 0,5N (enlever les protéines) et enfin 24 heures dans une solution de collagénase I (enlever le collagène résiduel). Les échantillons ainsi traités étaient ensuite rincés dans du PBS puis séchés avant de faire l'objet d'un dosage des fonctions COOH par la méthode dite du TBO (voir Annexe X) (144).

4.2.2.3 Innocuité de PLM-CD implantée dans un modèle canin

La Figure 31 est un diagramme de flux montrant le design des expérimentations réalisées à partir du modèle canin décrit plus haut. Vingt-quatre (24) chiens, répartis en 2 groupes, étaient implantés au niveau de chaque carotide d'un substitut vasculaire synthétique en PET de 6 mm de diamètre. Le groupe 1 avait l'implantation d'une PLM d'un côté (témoin) et d'une PLM-CD de l'autre sans rajout de molécule bio active. Le groupe 2 avait l'implantation d'une PLM-CD d'un côté (témoin) et de l'autre une PLM-CD fonctionnalisée avec des antibiotiques.

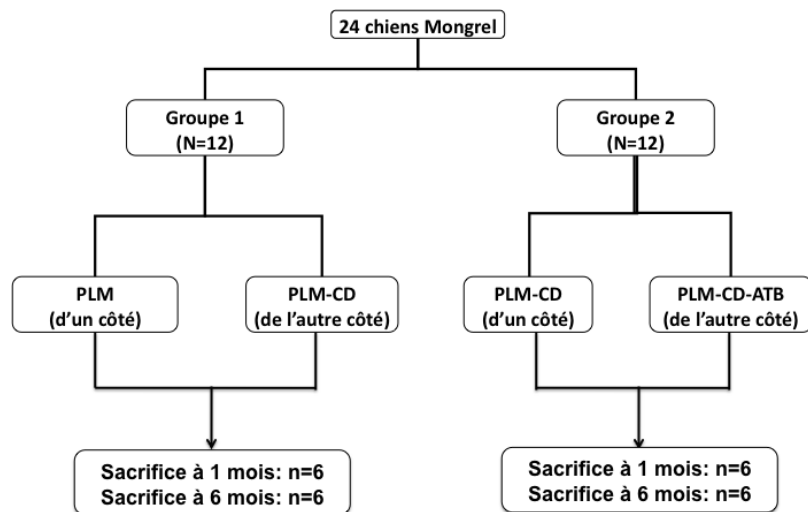


Figure 31 : Design expérimental des investigations réalisées chez le chien

Le choix du côté de l'implantation pour la prothèse test ou pour la prothèse témoin était laissé complètement aléatoire dans les 2 groupes. En postopératoire chaque chien reçut 75 mg d'aspirine par jour pendant 1 mois. Le suivi post-opératoire était quotidien et étalé sur 1 ou sur 6 mois. Au bout de chacune de ces périodes de suivi, 6 des 12 animaux de chaque groupe étaient sacrifiés (Figure 31). Le sacrifice était réalisé par l'injection d'une dose létale de barbituriques. Des prélèvements sanguins [créatinine sérique, alanine amino transferase (ALAT), aspartate aminotransferase (ASAT), bilirubine sérique] étaient réalisés préalablement aux implantations et les jours d'euthanasie. Ces données biologiques étaient évaluées pour déceler à 1 mois et à 6 mois toute répercussion de la présence du poly-CTR-HPβCD sur les fonctions rénale et hépatique.

Le degré de cicatrisation, la tolérance locale du matériau, la perméabilité du pontage, l'encapsulation du greffon dans les tissus environnants ainsi que les organes vitaux (cœur, poumons, reins, cerveau...) étaient évalués macroscopiquement. Les critères de cet examen macroscopique sont rapportés dans le Tableau 4. Des biopsies étaient réalisées au niveau de tous les sites d'implantation systématiquement et au niveau de tout tissu ou organe d'allure suspecte à l'examen macro. La fixation des spécimens histologiques prélevés était faite dans une solution tampon de formaldéhyde à 10%. Une coloration classique des pièces histologiques était réalisée au trichrome pour grader semi quantitativement la sévérité (Schuh 2008) d'éventuelles anomalies histologiques comme rapportées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Echelle semi quantitative pour les évaluations macroscopique et microscopique après implantation de prothèses vasculaires

Paramètres évalués		Echelle semi quantitative				
Examen micro	Examen macro	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
Thrombogénicité	Thrombus	Absent	Légère	Modérée	Marquée	Sévère ou totale
Sérome Oedème Erythème	Fibrine Polynucléaires Macrophages Lymphocytes Plasmocytes Cellules géantes					
Nécrose	Nécrose					
Développement de tissu fibreux hyperplasie tissulaire	Fibroblastes Fibrose Intégration tissulaire Calcifications					
Dilatation du greffon	dégradation du greffon					
Néo vascularisation	Néo vascularisation					
Néointima	Cellules endothéliiformes Hyperplasie myointiale					

4.2.2.4 Efficacité antimicrobienne de PLM-CD chargée d'antibiotiques

4.2.2.4.1 Les souches bactériennes

Sept agents bactériens, pathogènes pour l'homme, parmi les plus couramment rencontrés dans les infections de prothèse vasculaire (IPV) (145, 146) ont été sélectionnés pour être testés au cours de cette étude. Il y avait 4 cocci Gram positif et 3 bacilles Gram négatif listés tous ci-dessous :

Staphylococcus aureus (CIP 224), couramment appelé staphylocoque doré, est un cocci Gram positif souvent impliqué de nos jours dans les infections d'origine nosocomiale. L'émergence de multiples souches résistantes a déterminé qu'on s'y réfère de plus en plus en précisant sa sensibilité à la méticilline : *Staphylococcus aureus* méti sensible ou méti-S. On trouve naturellement le staphylocoque doré chez l'homme et les animaux à sang chaud. Chez

l'homme, il prédomine dans les zones humides comme la muqueuse nasale, le pharynx, les aisselles et les mains. Il y aurait 30 à 50% de porteurs asymptomatiques (nez, gorge) au sein de la population hospitalière et cette bactérie serait responsable de 9% à 49% des bactériémies nosocomiales (52, 146).

Staphylococcus epidermidis (05013), ou staphylocoque blanc, est un coque à Gram positif qui se différencie de *Staphylococcus aureus* par l'absence de l'activité coagulase. Il est donc dit staphylocoque à coagulase négative. Cette bactérie est un germe saprophyte de la peau et des muqueuses. Contrairement à *S. aureus*, il est faiblement pathogène pour l'homme mais est toutefois impliqué dans nombre d'infections nosocomiales. *Staphylococcus epidermidis* devient très infectant sur les implants étrangers dans l'organisme humain et a la faculté de rester quiescent longtemps après son inoculation. Il sécrète à la surface des biomatériaux le slime, sorte de complexe polysaccharidique lui permettant de former un biofilm le protégeant de l'activité des antibiotiques et du système immunitaire de l'hôte (147).

Staphylococcus aureus résistant à la méticilline (SARM)) mais sensible à la rifampicine (07001), est une souche de *S. aureus* dite multi résistante (référé souvent comme *S. aureus* méti-R). Elle présente donc une résistance particulière à certains antibiotiques de la famille des β -lactamines. Ce type de bactérie est de plus en plus souvent mis en cause dans des infections communautaires et nosocomiales (148, 149). De plus le SARM représente 11% à 66% des cas d'infections nosocomiales à *S. aureus*. Les SARM pourraient causer approximativement 37% des infections de prothèses vasculaires.

Staphylococcus aureus résistant à la méticilline et résistant à la rifampicine (SARM-rés-RFP (09005)), est une souche de SARM ayant développé une résistance contre la rifampicine. Son émergence comme agent causal d'infections prothétiques rend bien compte de l'écologie changeante des infections chirurgicales vasculaires.

Escherichia coli (L70A4) est une entérobactérie à Gram négatif, aussi appelée colibacille, car il s'agit d'un saprophyte intestinal humain. Sa transmission est féco-orale ou directe. La quantification des colibacilles est un indicateur courant de contaminations fécales et atteste par exemple de la qualité potable ou non de l'eau. Cette espèce reste un germe opportuniste souvent impliqué dans des bactériémies, dans les infections urinaires et possède un pouvoir invasif important quand en contact avec un implant étranger.

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27583) est une bactérie à Gram négatif non sporulé possédant un cil polaire lui permettant d'être mobile. Il est aussi appelé bacille pyocyannique car sécrétant deux pigments caractéristiques : la pyocyanine de couleur bleu verte et la pyoverdine de couleur jaune verte. Cette bactérie est ubiquitaire des sols, des végétaux et des

eaux. Elle est dite pathogène opportuniste chez l'homme et résiste à de nombreux antibiotiques et antiseptiques. *Pseudomonas aeruginosa* est cependant incriminé dans des infections nosocomiales souvent sévères. Il est particulièrement virulent chez les malades immunodéprimés et quand associé à des infections d'implants médicaux en chirurgie cardiaque, en chirurgie vasculaire et en chirurgie orthopédique.

Enterobacter cloacae (IR129i2B) est une bactérie à Gram négatif, pouvant être impliquée dans les infections de plaies opératoires et aboutir à des septicémies. Cette bactérie est normalement présente dans le tube digestif humain et dans l'environnement. Sa transmission est surtout directe ou locale. *Enterobacter cloacae* est relativement moins fréquent dans les infections de prothèses vasculaires mais qui, par sa résistance naturelle à de nombreux antibiotiques, comme les pénicillines, ou les céphalosporines, constitue un bon modèle de l'écologie en évolution de ces infections.

4.2.2.4.2 Test d'adhésion bactérienne (in vitro)

Pour réaliser ce test, un inoculum bactérien était préparé en transférant dans un bouillon Müller Hinton (MH) de 10 ml de volume des colonies bactériennes à l'aide d'une pipette Pasteur stérile obturée au bout à partir d'une préculture de 24h sur gélose Müller-Hinton. La densité bactérienne a été déterminée par dilutions décimales successives. Des échantillons de PLM-CD (Ø 6 mm) chargés en antibiotique étaient placés individuellement dans une boîte Costar® 24-puits et inoculés avec la suspension bactérienne appropriée (2 ml/puits). L'incubation était réalisée à 37°C pendant quinze (15) minutes. Des échantillons de PLM inoculés et incubés dans les mêmes conditions servaient de témoins. Chaque échantillon était rincé après la période d'incubation dans 5 ml de PBS afin d'enlever les bactéries planctoniques n'ayant pas adhéré sur le support en PET. Les échantillons étaient mis ensuite toujours individuellement dans des tubes en verre stériles contenant chacun 10 ml de PBS frais. Ces tubes faisaient l'objet d'un traitement par ultrasons (35 kHz) pendant une minute et ont été agités 30 secondes par un vortex de façon à remettre en suspension toutes les bactéries viables adhérentes au support. Des dilutions décimales successives de ce mélange étaient réalisées dans des tubes stériles de 9 ml de volume en utilisant une solution Ringer cystéiné. Des aliquotes de 0.1 ml étaient à chaque fois prélevées de ces tubes pour ensemercer des géloses MH qui étaient incubées à 37°C pendant 24 heures. Une procédure classique de décomptage bactérien était réalisée à la fin de cette période d'incubation. Pour chacune des boîtes de Pétri affichant entre 15 et 150 colonies bactériennes ce compte était rapporté au volume en ml de la solution initiale de détachement des bactéries. Le nombre de bactéries (N)

ayant adhéré sur un échantillon était exprimé en UFC /ml et donné par la formule suivante : $N = n \times 10 \times 10^d$ ou n est le nombre de colonies bactériennes compté sur la boîte la plus interprétable et d : la dilution en valeur absolue à laquelle les colonies ont été comptées. Les résultats étaient ensuite transformés en pourcentage de la charge bactérienne adhérente sur les échantillons témoins (PLM) qui correspondait à 100% d'adhésion bactérienne. L'expérience a été menée en triplicate pour chaque espèce bactérienne incluse dans cette étude et est rapportée sur une échelle logarithmique comme une moyenne des pourcentages d'inocula bactériens ayant adhéré sur chacun des supports prothétiques testés.

4.2.2.4.3 Test d'inhibition de la croissance bactérienne (in vitro)

Ce test était réalisé en appliquant la méthode dite de diffusion ou du Kirby-Bauer test (150). Des échantillons PLM (témoin) et PLM-CD chargés en antibiotiques (test) étaient laissés individuellement dans du plasma sanguin humain (Etablissements français du sang, Lille) pendant 7 jours à 37°C et sous agitation (80 rpm). Le milieu plasmatique était renouvelé toutes les 24 heures pendant cette période de 7 jours à raison de 2ml par pastille prothétique de 6 mm. Il y avait ainsi une désorption progressive de l'antibiotique chargé sur les supports prothétiques comme rapporté antérieurement (142), mimant une libération dans le flux sanguin humain et intégrant les interactions potentielles du médicament avec les cristalloïdes et les protéines plasmatiques. Une suspension bactérienne était préparée comme dans l'expérience précédente et sa concentration ajustée à 1×10^4 UFC/ml. Les échantillons en triplicate étaient quotidiennement et progressivement retirés du milieu. Ils étaient rincés avec du PBS puis déposés sur une gélose Mueller Hinton (MHA)ensemencée auparavant par une suspension bactérienne appropriée (0,1 ml/gélose MHA). Les géloses MHA ainsi préparées étaient mises en incubation à 37°C pendant 24 heures en aérobose. En fonction de l'activité et de la quantité d'antibiotiques résiduels sur les échantillons, une zone plus ou moins large d'inhibition de la croissance bactérienne était observée.

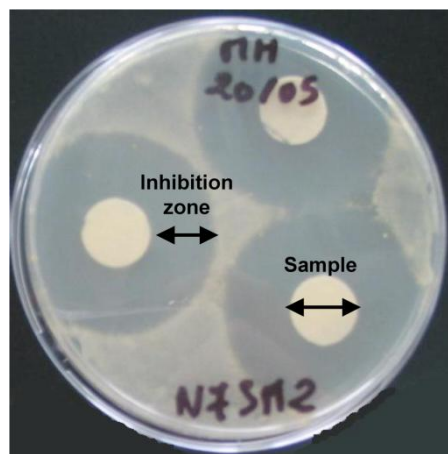


Figure 32 : Gélose Müller Hinton ensemencée de bactéries. Pastilles de PLM ou PLM-CD chargé en antibiotiques avec une zone d'inhibition correspondant au halo clair autour de la pastille.

Le diamètre moyen de cet halo d'inhibition était proportionnel à la quantité d'antibiotiques disponible sur les supports prothétiques et ayant diffusé dans la gélose. Ce test permettait aussi d'apprécier indirectement sur 7 jours la cinétique de libération de tout médicament ayant conservé après adsorption sur des prothèses en PET une activité antibactérienne effective. La limite minimale de détection était de 6 mm, soit la taille des échantillons utilisés. Cette expérience a été conduite séparément pour chaque espèce bactérienne concernée par ces travaux.

4.2.2.4.4 Activité antibactérienne *in vivo*

Dans le but de déterminer l'activité antibactérienne des prothèses vasculaires fonctionnalisées par le poly-HPBCD et chargées en antibiotiques, quatre-vingt quatre souris étaient réparties de manière aléatoire dans 7 groupes différents en accord avec les 7 bactéries sélectionnées pour cette étude. Chaque groupe comportait 12 souris (inoculation par une espèce bactérienne donnée) qui étaient randomisées (1 : 1) en double aveugle pour recevoir en implantation sous cutanée la PLM (témoin : 6 souris) ou la PLM-CD (test : 6 souris) chargée d'un antibiotique (RFP, CFX ou VCY). Une suspension bactérienne était préparée dans une solution de Ringer cystéiné (RC) à une concentration de $1,0 \times 10^9$ UFC/ml pour toutes les bactéries à l'exception de *P. aeruginosa*. Pour cette dernière espèce bactérienne, la taille de l'inoculum infectant, non immédiatement létale, était de $1,0 \times 10^8$ UFC/ml comme déterminée lors d'une étude préliminaire (données disponibles non rapportées). Les souris ont été sacrifiées au 7ème jour comme mentionné antérieurement.

Les changements macroscopiques compatibles avec une infection cliniquement manifeste au niveau des sites d'implantation et au niveau des échantillons prothétiques étaient notés et

gradés de 0 à 4 comme suit : grade 0, aucun signe; grade 1, écoulement séreux discret ; grade 2, écoulement purulent léger à modéré ; grade 3, écoulement purulent sévère ; et grade 4, formation d'abcès sous-cutané, déhiscence de la plaie et/ou nécrose tissulaire périprothétique. Les échantillons prothétiques ont été alors explantés et récupérés dans 5 ml d'une solution de PBS. L'étude bactériologique consistait en un dénombrement et en une identification des bactéries viables ayant colonisé les échantillons prothétiques. La mise en suspension des bactéries adhérees à l'échantillon était pratiquée dans 10 ml de PBS isotonique frais contenu dans des tubes en verre. Ces tubes faisaient l'objet d'un traitement par ultrasons (35 kHz) pendant une minute et ont été agités 30 secondes par un vortex de façon à remettre en suspension toutes les bactéries viables adhérees au support. Des dilutions décimales successives de ce mélange étaient réalisées dans des tubes stériles de 9 ml de volume en utilisant une solution Ringer cystéiné. Des aliquotes de 0.1 ml étaient à chaque fois prélevées de ces tubes pour ensemercer des boîtes de Pétri (gélose MH) qui étaient incubées à 37°C pendant 24 heures. Une procédure classique de décomptage bactérien était réalisée à la fin de cette période d'incubation. Pour chacune des boîtes de Pétri affichant entre 15 et 150 colonies bactériennes ce compte était rapporté au volume en ml de la solution initiale de détachement des bactéries. Le nombre de bactéries (N) ayant adhéré sur un échantillon était exprimé en UFC /ml et donné par la formule suivante: $N = n \times 10 \times 10d$ ou n est le nombre de colonies bactériennes compté sur la boîte la plus interprétable et d: la dilution en valeur absolue à laquelle les colonies ont été comptées. Les résultats étaient ensuite transformés en pourcentage de la charge bactérienne effective avec laquelle les souris implantées étaient inoculées. L'expérience menée en six répliques pour chaque espèce bactérienne incluse dans cette étude est rapportée sur une échelle logarithmique comme une moyenne des pourcentages d'inocula bactériens ayant proliféré sur PLM ou sur PLM-CD au terme des 7 jours d'implantation chez la souris.

4.2.2.5 Analyse statistique

L'analyse statistique était réalisée en utilisant le logiciel StatView®6.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Les tests de rang de Wilcoxon et U de Mann-Whitney étaient utilisés pour la comparaison entre deux groupes respectivement des variables continues appariées ou non appariées. Pour les comparaisons multiples ou pour les mesures répétées, un test de Kruskal-Wallis ou une analyse de variance (ANOVA) suivie de tests post-hoc selon Bonferroni-Dunn étaient réalisés pour comparer les données comme appropriées. Le niveau de significativité statistique était défini pour une valeur de $p \leq 0.05$ sauf quand précisé.

4.3 Résultats

4.3.1 Capacité d'adsorption et cinétique de libération des agents antimicrobiens

4.3.1.1 Apport du poly-CTR-HP β CD sur la capacité d'adsorption

Des échantillons de PLM et de PLM-CD (N = 5) étanchéifiées au collagène étaient plongés pendant 25 minutes dans des solutions de RFP (60 g/L), de VCY (50 g/L) et de CFX (2 g/L). La quantité d'antibiotiques adsorbés sur ces échantillons au bout de la période et déterminée par spectrophotométrie est rapportée à la Figure 33. Cette figure montre une quantité de CFX chargée sur PLM-CD (fonctionnalisé par le poly-CTR-HP β CD) 6,8 fois supérieure (P=0,02) à celle chargée sur PLM (dépourvu du poly-CTR-HP β CD). La RFP était adsorbée en quantités équivalentes sur PLM et sur PLM-CD (P=0,60). La quantité de VCY chargée par PLM-CD était 1,2 fois seulement supérieure sur PLM-CD comparée à PLM (P=0,04).

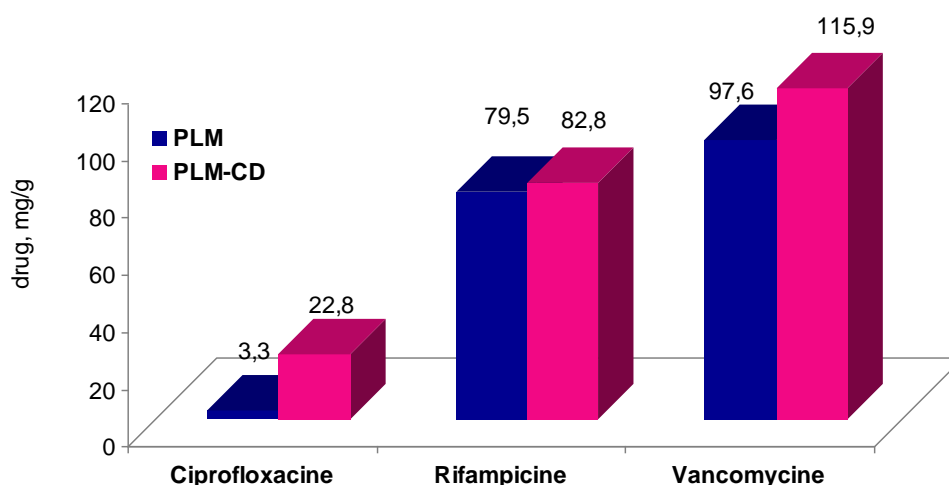


Figure 33 : Quantité d'antibiotiques chargée sur les échantillons PLM et PLM-CD et déterminée par spectrophotométrie. (Test de Mann Whitney → CFX : PLM-CD vs PLM, P=0.02; RFP: PLM-CD vs PLM, P=0.60 ; VCY : PLM-CD vs PLM, P=0.04).

4.3.1.2 Influence du temps d'imprégnation

Dans le but de déterminer la cinétique d'adsorption des antibiotiques sur les prothèses modifiées, l'expérience précédente fut répétée en faisant varier le temps d'imprégnation des échantillons de PLM-CD dans des solutions à concentration fixe de RFP (60 g/L), de VCY (50 g/L) et de CFX (2 g/L). Ainsi nous avons réalisé l'expérience pour des temps

d'imprégnation allant de 5 minutes à 4 heures. La **Figure 34** montre l'influence de cette variation sur la quantité d'antibiotiques absorbés par ces échantillons de PLM-CD.

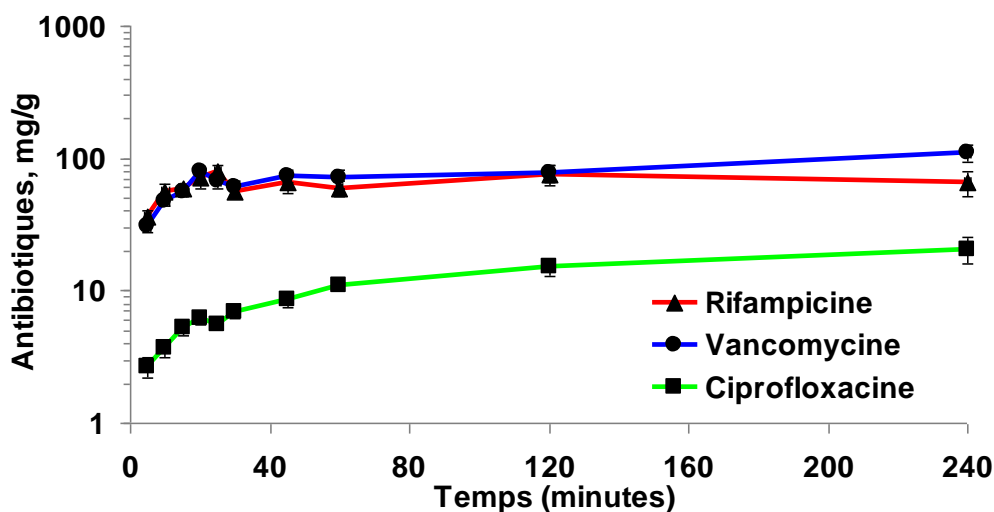


Figure 34 : Influence du temps d'imprégnation des échantillons dans la ciprofloxacine (2 g/L), dans la rifampicine (60 g/L) et dans la vancomycine (50 g/L) sur la capacité d'adsorption de PLM-CD

La quantité d'antibiotiques adsorbée sur les prothèses vasculaires en PET traité par le poly-CTR-HP β CD augmente avec le temps pour atteindre un plateau dès la 20^{ème} (VCY et RFP) et 60^{ème} (CFX) minute d'imprégnation. Cette cinétique d'adsorption semble compatible avec la pratique clinique pour une préparation extemporanée de ces prothèses dont l'imprégnation en antibiotiques peut être réalisée une trentaine de minutes seulement avant l'implantation. Pour la suite des expériences, le temps optimal d'imprégnation a donc été fixé à 25 minutes. Ceci représente 100%, 62% et 27% du taux de chargement à 4 heures respectivement pour la RFP, la VCY et la CFX.

4.3.1.3 Influence de la concentration de la solution d'antibiotique

Dans le but de déterminer si la concentration de la solution d'antibiotiques affectait la quantité maximale d'antibiotiques adsorbée sur les prothèses vasculaires fonctionnalisées (PLM-CD) nous avons redéfini les conditions de l'expérience précédente. Des échantillons de PLM-CD ont été imprégnés pendant 25 minutes dans des solutions de titre variable de CFX (0,06 ; 0,2 ; 0,4 ; 1 ; 2 g·L⁻¹, figure 14) de VCY (1.66 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 g·L⁻¹, Figure 13) et de RFP (2 ; 6 ; 12 ; 30 ; 60 g·L⁻¹, Figure 35).

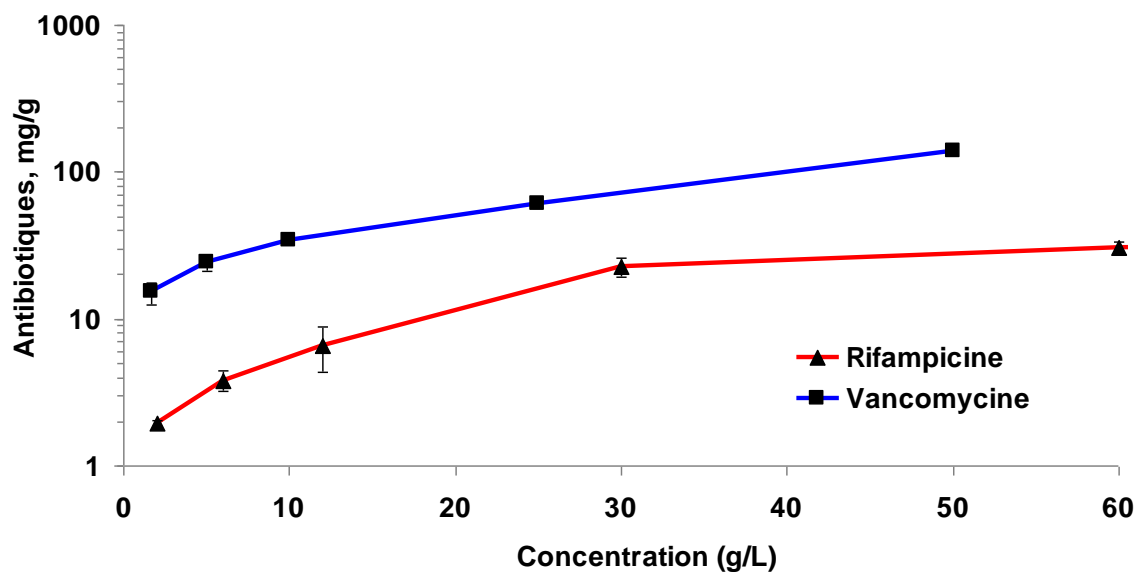


Figure 35 : Influence de la concentration de rifampicine et de vancomycine après 25 minutes d'imprégnation sur la capacité d'adsorption de PLM-CD

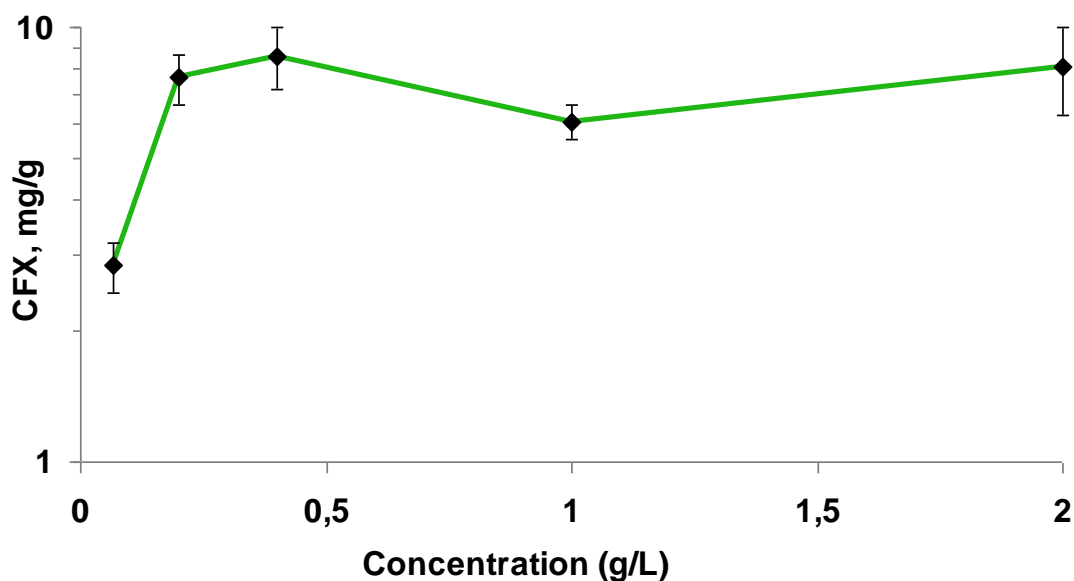


Figure 36 : Influence de la concentration de ciprofloxacine après 25 minutes d'imprégnation sur la capacité d'adsorption de PLM-CD

L'étude de ces courbes montre, avec l'augmentation du titre des solutions d'imprégnation des échantillons, une évolution quasi linéaire jusqu'à l'équilibre de la quantité de RFP, de VCY et de CFX adsorbés sur PLM-CD. Pour la RFP, un palier était obtenu dès la concentration de 30 g/L. Pour la VCY le palier était obtenu dès 25 g/L. Pour la CFX, le palier était atteint à partir de 0,4g/L. Actuellement ces antibiotiques existent sur le marché à des concentrations précises compatibles avec une activation optimale des prothèses fonctionnalisées par les

cyclodextrines. Des concentrations plus élevées seraient à développer en vue de s'adapter à certains contextes cliniques.

4.3.1.4 Cinétique de libération en flux continu (méthode USP4)

Au cours de cette expérience, la cinétique de libération de trois antibiotiques à partir de PLM et de PLM-CD a été déterminée en utilisant le modèle *in vitro* en flux continu USP IV. Nous avons mis en évidence des différences qui complètent les observations faites au cours des expérimentations précédentes.

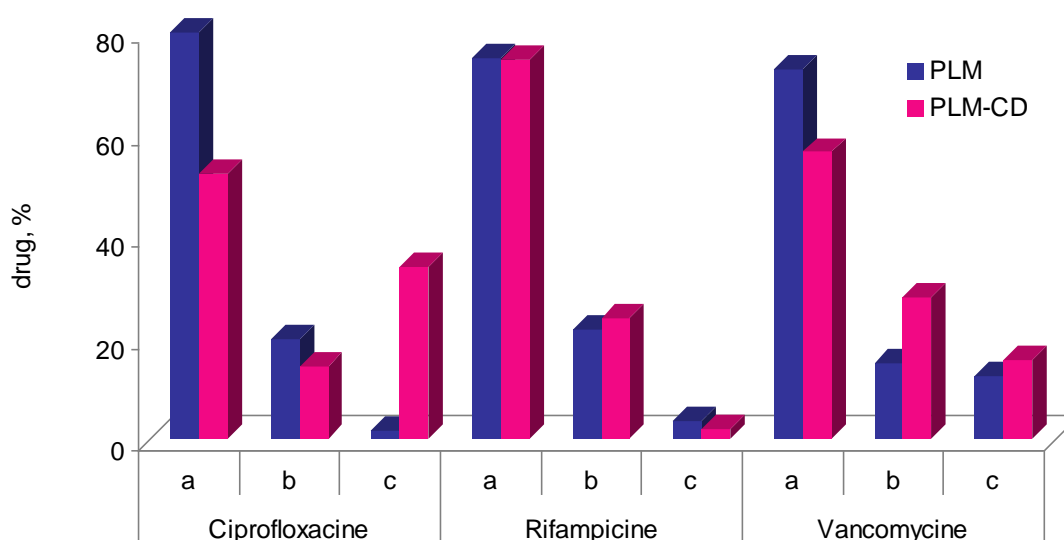


Figure 37 : Modèle de circulation en flux continu (USP IV) : Quantité totale de médicaments (drug) libérés dans le milieu PBS (a) ; Quantité ayant diffusé dans le gel (b) ; Quantité restant sur la prothèse (c).

La Figure 37 présente pour la PLM (témoin) et la PLM-CD (test) les taux comparatifs des trois antibiotiques libérés dans le PBS (a) au bout d'une heure de circulation en flux continu dans le système USP4. Elle expose également les quantités ayant diffusé dans le gel (b) ou restant sur la prothèse (c). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité totale imprégnée sur les prothèses et précédemment rapportée sur la Figure 33. Ainsi, les quantités respectives de RFP libérée dans le milieu (75% vs 74%), ayant diffusé dans le gel (21% vs 24%) ou restant sur la prothèse (3,5 vs 2%) étaient également équivalentes entre PLM et PLM-CD au bout d'une heure de circulation en flux continu. En ce qui a trait à la CFX, 80% de la quantité chargée sur PLM contre seulement 52% sur PLM-CD étaient déjà libérés en une heure de circulation en flux continu. Il y avait aussi une différence nette sur la capacité des prothèses PLM-CD à retenir la CFX (34% restant sur le support vs 1% pour PLM) alors

qu'une quantité significativement moins importante de CFX diffusait dans le gel à partir de PLM-CD (14%) contre 19% pour PLM. Concernant la VCY, l'élution à partir de PLM dans le milieu PBS en circulation était également plus importante : 73% vs 56% en 1 heure pour PLM-CD. De même, alors que 28% de la quantité totale de VCY restaient sur PLM-CD vs 15% pour PLM, un taux équivalent de diffusion vers le gel était noté entre ces deux prothèses (12% vs 16%). Le contraste devient encore plus frappant si l'on considère la cinétique de libération des 3 antibiotiques sur la première heure de circulation en flux continu de PBS dans le système USP4.

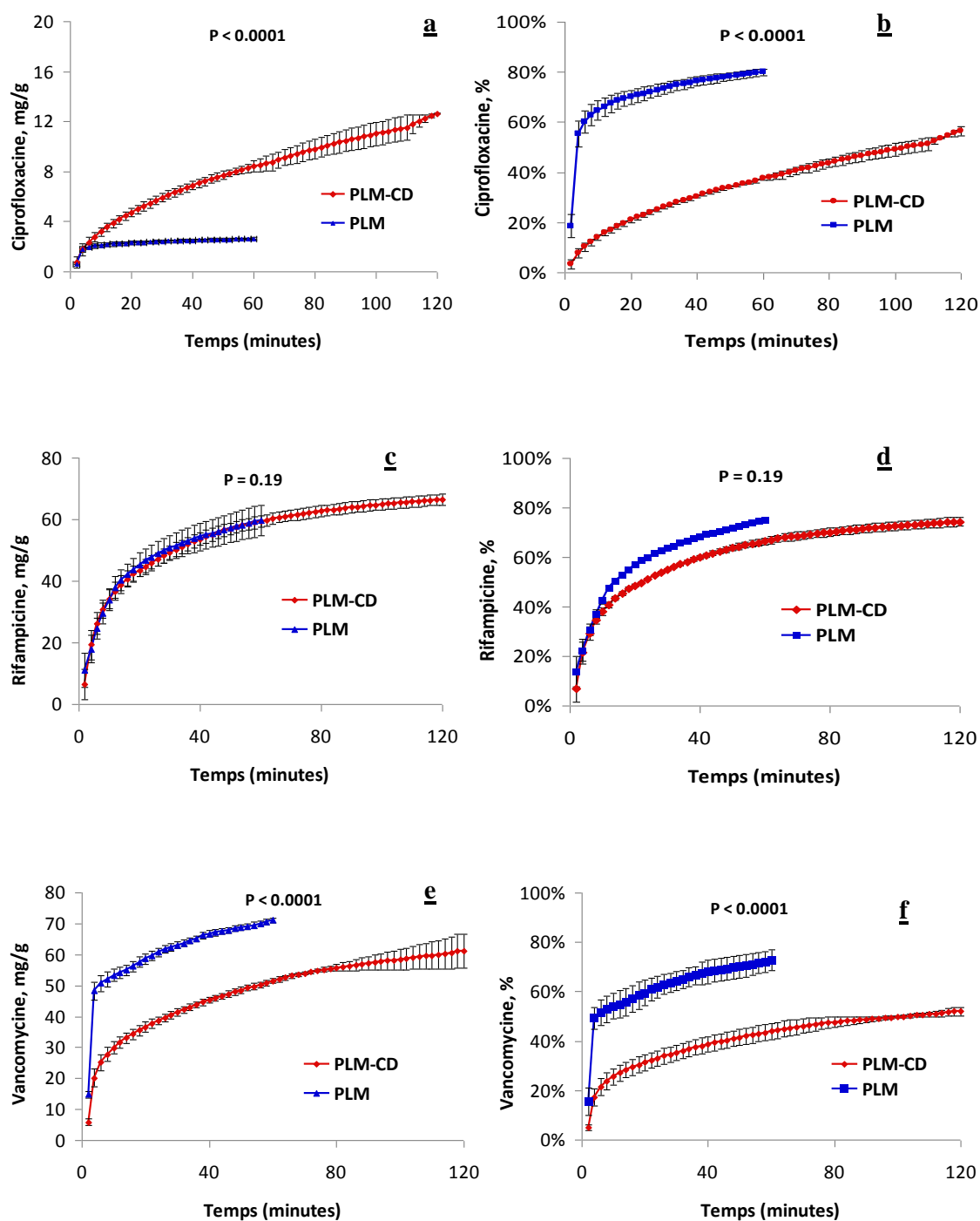


Figure 38 : Cinétique de libération de la ciprofloxacine (a, b), de la rifampicine (c, d) et de la vancomycine (e, f) à partir de PLM et de PLM-CD imprégnée pendant 25 minutes dans une solution de ciprofloxacine (2 g/L); de rifampicine (60 g/L) ou de vancomycine (50 g/L). Valeurs de P par ANOVA suivie de Bonferroni-Dunn.

La Figure 38 (a & b) présente la cinétique de libération de la CFX dans le PBS pendant 2 heures. La quantité de CFX libérée à partir de PLM-CD était supérieure à celle libérée à partir de PLM à n'importe quel temps de libération considéré (Figure 38a). Les résultats montrent

de plus que la quasi-totalité de la libération de la CFX (60%) s'est faite au cours des 10 premières minutes dans le cas de la PLM (Figure 38b). Pour la PLM-CD, en revanche, la libération était lente et progressive. Elle n'atteignait les 60% qu'en plus de 2H de libération en USP4. Ce qui laisse envisager une libération continue sur plusieurs jours que seule une investigation prolongée dans le temps permettrait de confirmer.

La Figure 38 (c & d) présente la cinétique de libération de la RFP dans le PBS pendant 2 heures. La courbe de libération obtenue à partir de PLM et celle obtenue à partir de PLM-CD étaient superposables dans le temps confirmant la notion connue des liaisons préférentiellement ioniques de la RFP avec les revêtements notamment de type gélatine ou collagène appliqués aux prothèses vasculaires. Toutefois la pente de la cinétique de libération se révèle plus lente en présence de PLM-CD quand la cinétique est rapportée par rapport à la quantité totale d'antibiotiques imprégnée, bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative Figure 38 (c. & b).

La cinétique de libération de la VCY, sur 2 heures, en flux continu dans le PBS, était améliorée en USP4 avec la présence du poly-CTR-HP β CD. La PLM libéra en quelques minutes près de 60% de sa charge de VCY tandis que l'allure de la courbe obtenue avec PLM-CD était compatible avec un mécanisme de libération prolongée persistant au-delà de la 2^{ème} heure date de la fin de l'expérimentation. Ce qui laisse envisager une libération continue prolongée que seule une investigation prolongée dans le temps permettrait de confirmer

4.3.2 Cinétique de dégradation du poly-CTR-HP β CD

4.3.2.1 Dégradation *in vitro* en milieu salin isotonique

Les résultats sont présentés sur la Figure 39 qui montre une évolution régulière et quasi linéaire de la dégradation du revêtement de cyclodextrine présent aussi bien sur la PLM-CD que sur la PLT-CD en 250 jours.

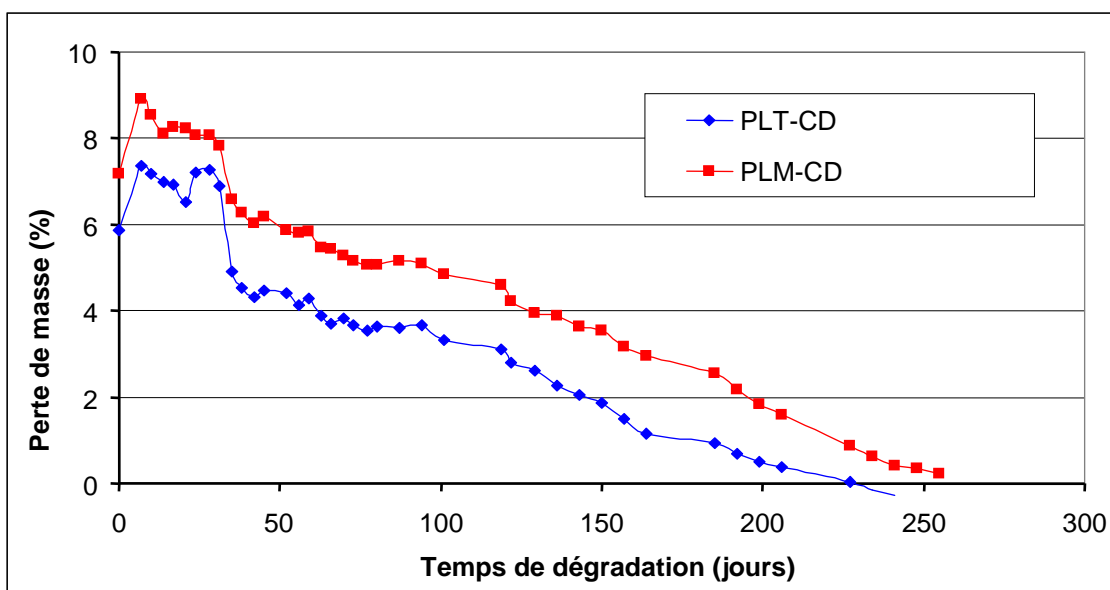


Figure 39: Dégradation du polymère de cyclodextrine fixé sur les prothèses vasculaires en milieu salin NaCl (0,9%) à 37°C sous agitation (100 tr/min).

On peut remarquer, pour les deux prothèses, une augmentation de la masse de ces dernières entre 0 et 7 jours. Cette augmentation est due au chlorure de sodium (NaCl) qui est resté fixé sur la prothèse pendant la pesée. En effet, ce n'est qu'au 30^{ème} jour de dégradation que nous avons appliqué un rinçage plus intense à l'eau ultrapure afin d'enlever les résidus de sel déposés sur la prothèse. L'effet de ce rinçage est bien observable par une chute brutale de la masse de la prothèse (30^{ème} jour). Ainsi, si on écarte cette erreur due à la présence du NaCl, une dégradation constante et linéaire du revêtement de cyclodextrine est observable jusqu'à 250 jours en milieu salin (0,9% NaCl, 37°C, 100 tr/min).

4.3.2.2 Dégradation *in vitro* en milieu plasmatique humain

La seconde étape de ce travail a été de déterminer le temps de dégradation du polymère de cyclodextrine *in vitro* dans un milieu plasma humain pour se rapprocher le plus possible des conditions réelles. Le dosage des fonctions COOH est réalisé toutes les semaines en même temps que le renouvellement du milieu plasma. Les résultats sont présentés sur la Figure 40.

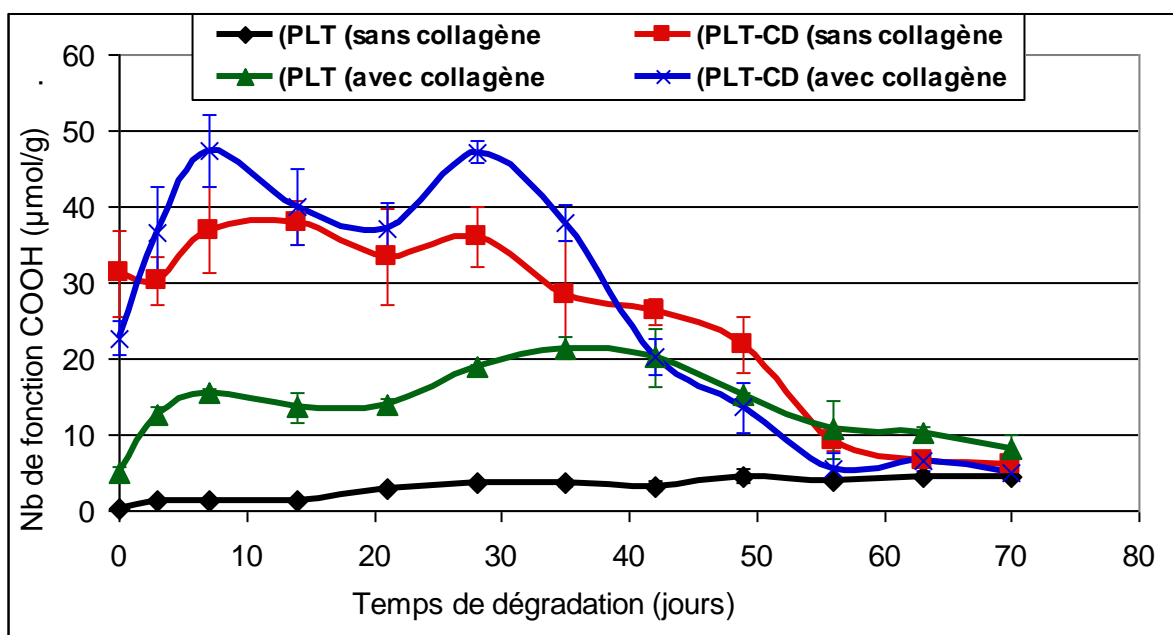


Figure 40 : Dégradation du poly-CTR-HPβCD en milieu plasma humain à 37°C sous agitation (100 tr/min).

Le nombre de fonctions COOH (Figure 40) était au cours de l'expérience en constante augmentation sur PLT non encore étanchéifiée par le collagène (de 0,28 à 4,52 au bout de 70 jours dans le plasma). Cela s'explique soit par l'adsorption des protéines plasmatiques persistant sur la prothèse même après le lavage (acetonitrile – PBS), soit par une dégradation lente du polyester constituant les fibres de la prothèse vasculaire. La PLT étanchéifiée par le collagène montre un taux plus élevé de fonctions COOH dû la présence du revêtement. Ce revêtement disparaît au bout de 70 jours (Figure 40). Pour les prothèses fonctionnalisées avec le poly-CTR-HPβCD (PLT-CD) dotées ou non d'un revêtement de collagène, il y a avait un nombre constant de fonction COOH pendant 30 jours puis une diminution pour obtenir le même nombre de fonctions COOH que la prothèse non fonctionnalisée (PLT) au bout de 70 jours.

4.3.2.3 Biodégradation dans le modèle canin de pontage carotidien

Le temps de dégradation du poly-CTR-HPβCD sur PLT-CD a été déterminé *in vivo* (implantation chez le chien) afin de vérifier les données *in vitro*. Des prothèses PLT implantées servaient de témoin. Le dosage des fonctions COOH était réalisé après 1 et 6 mois d'implantation dans le modèle canin. Les résultats sont présentés sur la Figure 41.

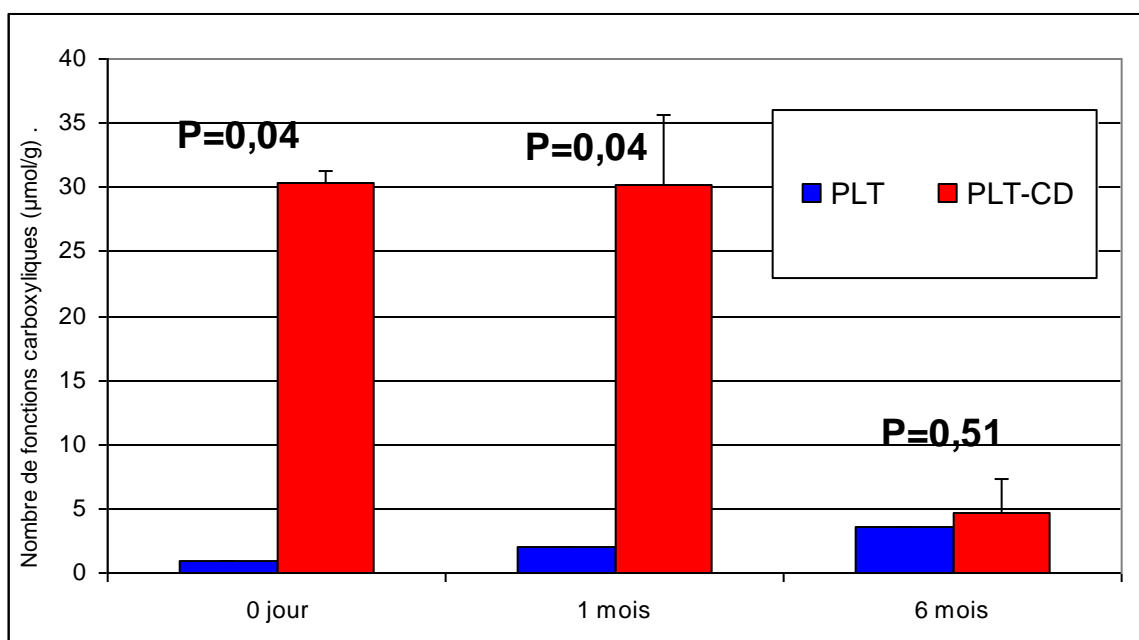


Figure 41 : Biodégradation (dosage des fonctions COOH) du poly-CTR-HPβCD après implantation chez le chien de prothèses vasculaires fonctionnalisées. (Valeurs de P par test de Mann Whitney).

La Figure 41 montre chez le chien une très nette différence dans le nombre de fonctions COOH présent à la surface entre la PLT et la PLT-CD avant l'implantation ($P=0,04$) et à 1 mois post-implantation ($P=0,04$). Ce qui reflète la présence du poly-CTR-HPβCD sur la PLT-CD. Au bout de 6 mois, en revanche, le nombre de fonctions COOH avait radicalement diminué sur la PLT-CD pour devenir identique à celui de la PLT ($P=0,51$). Ce qui suggère que le poly-CTR-HPBCD s'était complètement résorbé avant le 6^{ème} mois d'implantation chez le chien. Ce qui concorde avec les observations précédentes réalisées *in vitro*.

4.3.2.4 Etude de la dégradation du poly-CTR-HPβCD par spectrométrie de masse

Les prothèses PLM-CD et PLT-CD SANS collagène sont dégradées dans une solution saline NaCl (0,9%) pendant 250 jours. La solution est ensuite lyophilisée et analysée par spectroscopie de masse (electrospray, ESI). Les résultats sont présentés sur les Figure 42 et Figure 43.

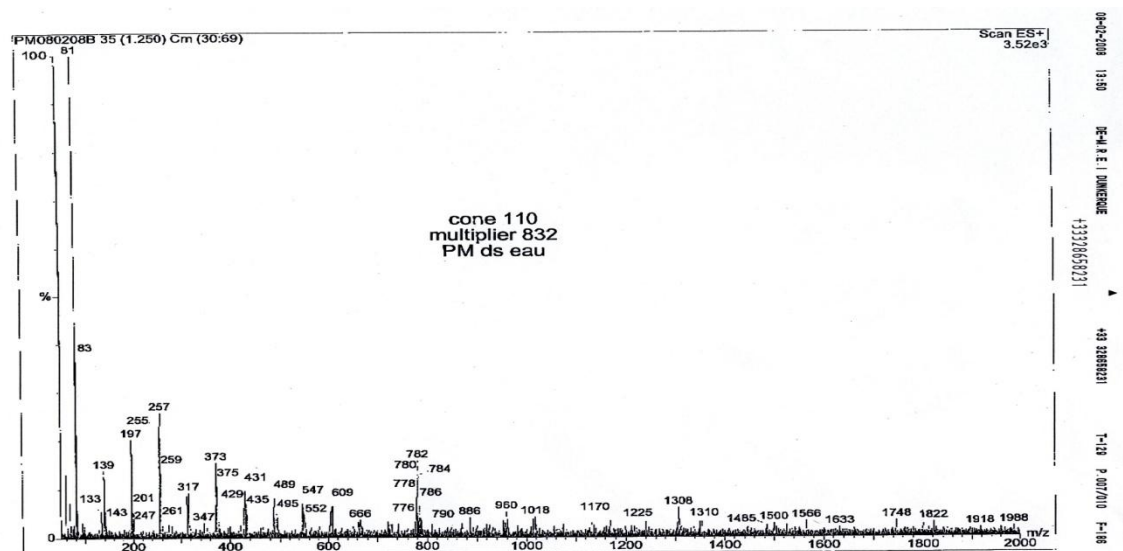


Figure 42 : Spectroscopie de masse ESI des produits de dégradation de la PLM-CD

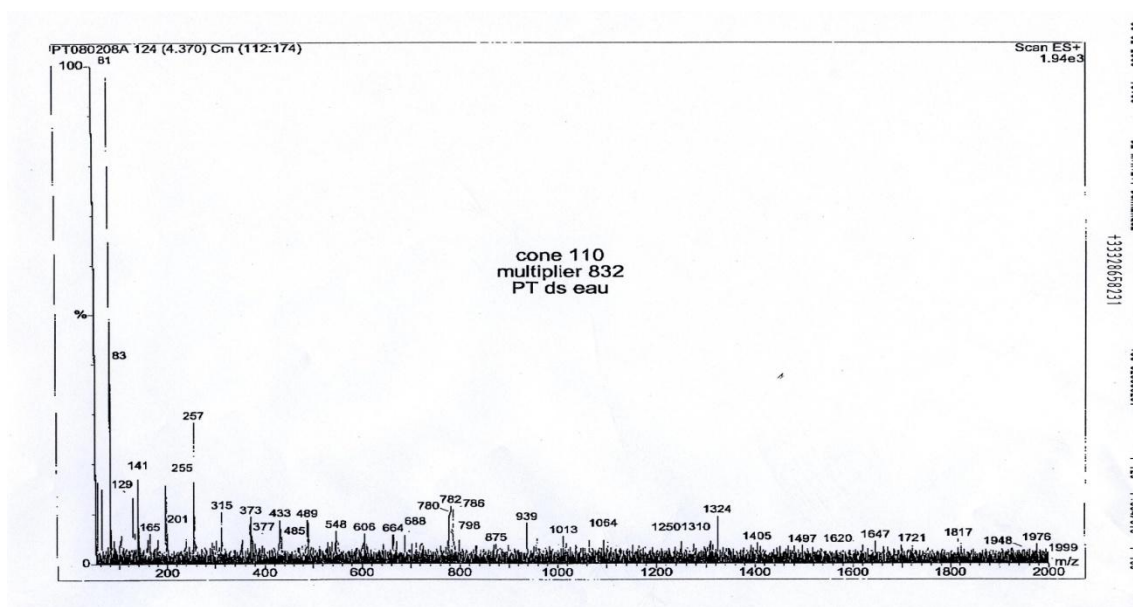


Figure 43 : Spectroscopie de masse ESI des produits de dégradation de la PLT-CD

L'analyse par spectroscopie de masse montre la présence de pics uniquement en dessous de m/z 1324 en utilisant un cône 110 (résultats identiques avec un cône 40). Cela montre que les produits de dégradation ne sont pas des polymères de cyclodextrines mais des cyclodextrines, des unités glucosidiques et de l'acide citrique.

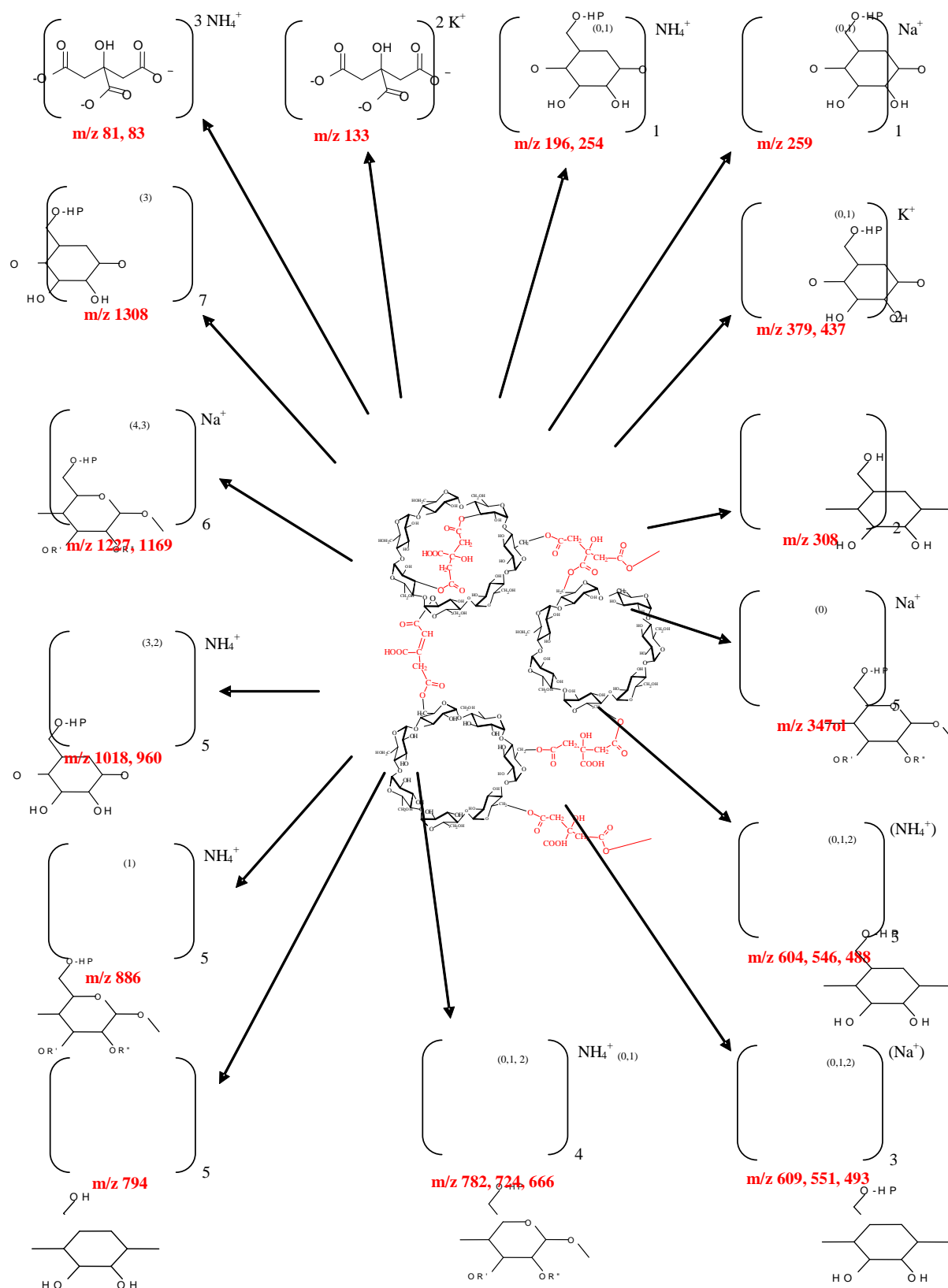


Figure 44 : Analyse des produits de dégradation du poly-CTR-HPβCD

Une étude approfondie des pics (Figure 44) a montré une dégradation en deux temps : premièrement une hydrolyse du poly-CTR-HP β CD pour former des cyclodextrines et de l'acide citrique (m/z 81) et dans un second temps une hydrolyse progressive de la cyclodextrine pour obtenir au final une unité glucosidique (m/z 196). A noter que cette analyse par technique électrospray permet d'ioniser les produits de dégradation sans les détruire.

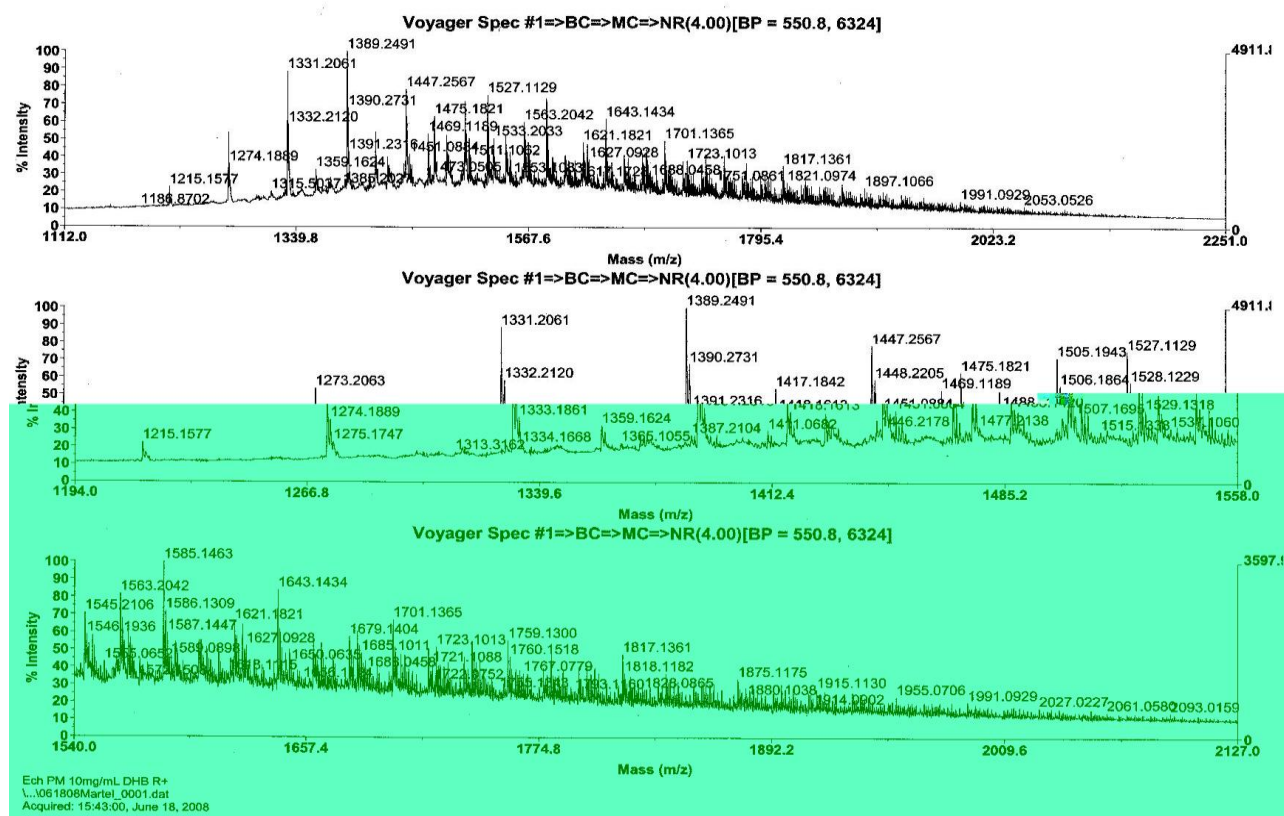


Figure 45 : Spectroscopie de masse des produits de dégradation de la PLM-CD (ELECTROSPRAY) : a) spectre intégral, b) et c) détails du spectre a)

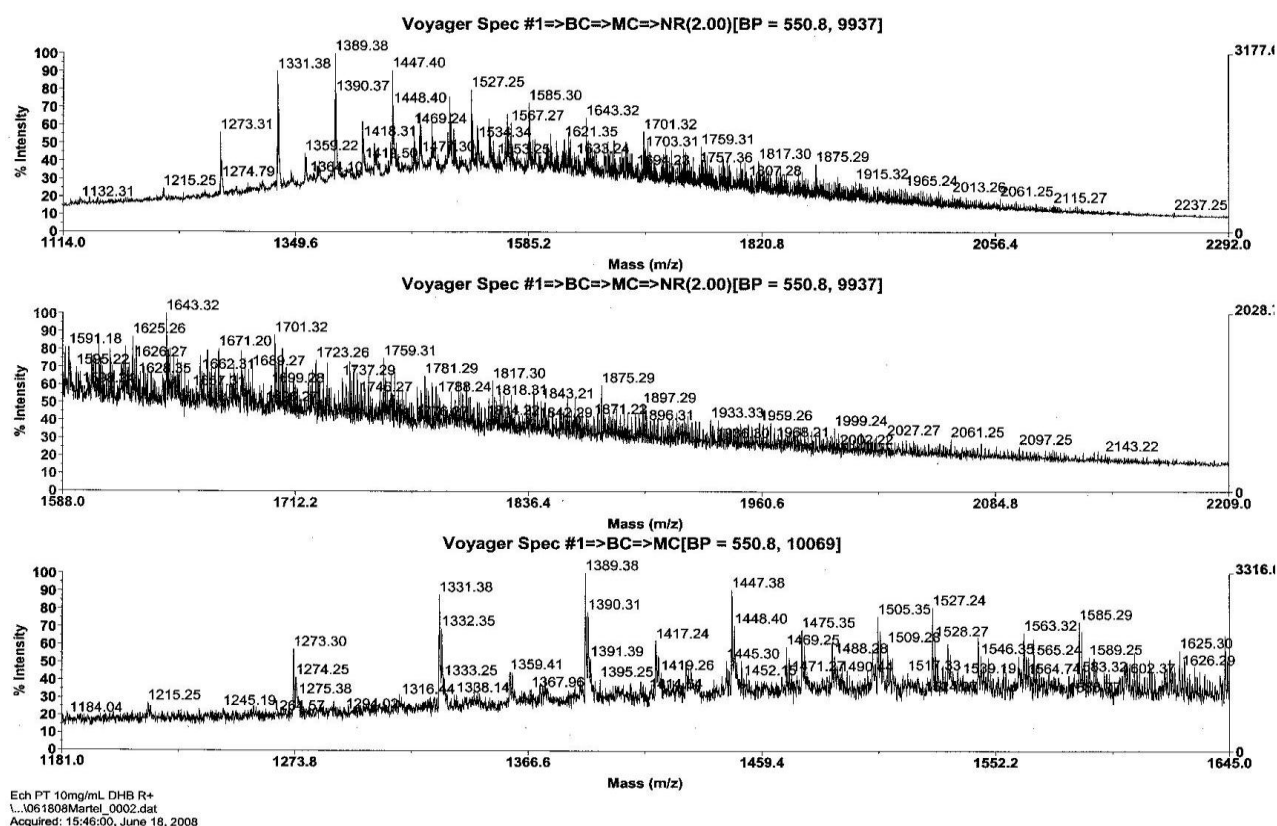


Figure 46 : Spectroscopie de masse (ElectroSpray) des produits de dégradation de la PLT-CD

De plus, une analyse complémentaire ELECTROSPRAY (utilisée pour les grandes masses molaires, n'a pas montré de pic au delà de la masse molaire de la HP β CD (Figure 45, Figure 46). Nous pouvons donc conclure que le poly-CTR-HP β CD fonctionnalisant les prothèses en PET se dégrade en citrate et en cyclodextrine qui elle-même est hydrolysée totalement pour donner des unités glucosidiques. L'étude par spectrométrie de masse a permis aussi de montrer les différentes formes de la HP β CD possédant de 0 à 5 unités hydroxypropyl (pics écartés de m/z 59 correspondant à la masse molaire d'une unité hydroxypropyle).

4.3.3 Innocuité et cicatrisation de PLM-CD

Au cours de cette expérience, nous avons déterminé l'innocuité et la cicatrisation des prothèses vasculaires fonctionnalisées par le poly-CTR-HP β CD et implantées dans un modèle canin de pontage carotidien. Quarante-huit artères ont été pontées chez 24 chiens avec aléatoirement d'un côté une prothèse test (PLM-CD ou PLM-CD chargée d'antibiotiques) et de l'autre une prothèse témoin (PLM ou PLM-CD respectivement). Toutes les procédures d'implantation étaient réalisées avec succès. Il n'y avait aucun décès péri opératoire ni de manifestations cliniques anormales postopératoires chez aucun des animaux implantés. En particulier, il n'y avait aucun signe clinique de toxicité aigue. La Figure 47 montre les

résultats des analyses sanguines (Créatinine sérique, ALAT, ASAT, Bilirubine sérique) réalisées chez ces chiens avant l'implantation des prothèses (J0), à 1 mois et à 6 mois post implantation. Aucun cas d'altération aigue ou de détérioration chronique de la fonction rénale ou hépatique n'a été noté comme l'illustre cette figure. Les valeurs sont restées pour chaque paramètre biologique évalué dans les limites de la normale. A 6 mois, le taux médian de créatinine sérique était légèrement augmenté par rapport aux valeurs de base avant l'implantation ou par rapport aux valeurs à 1 mois ; mais sans dépasser les limites de la normale. Les reins, de plus, n'ont rien montré d'anormal à l'examen macroscopique pour déterminer vers une étude histologique plus approfondie du tissu rénal (Figure 48).

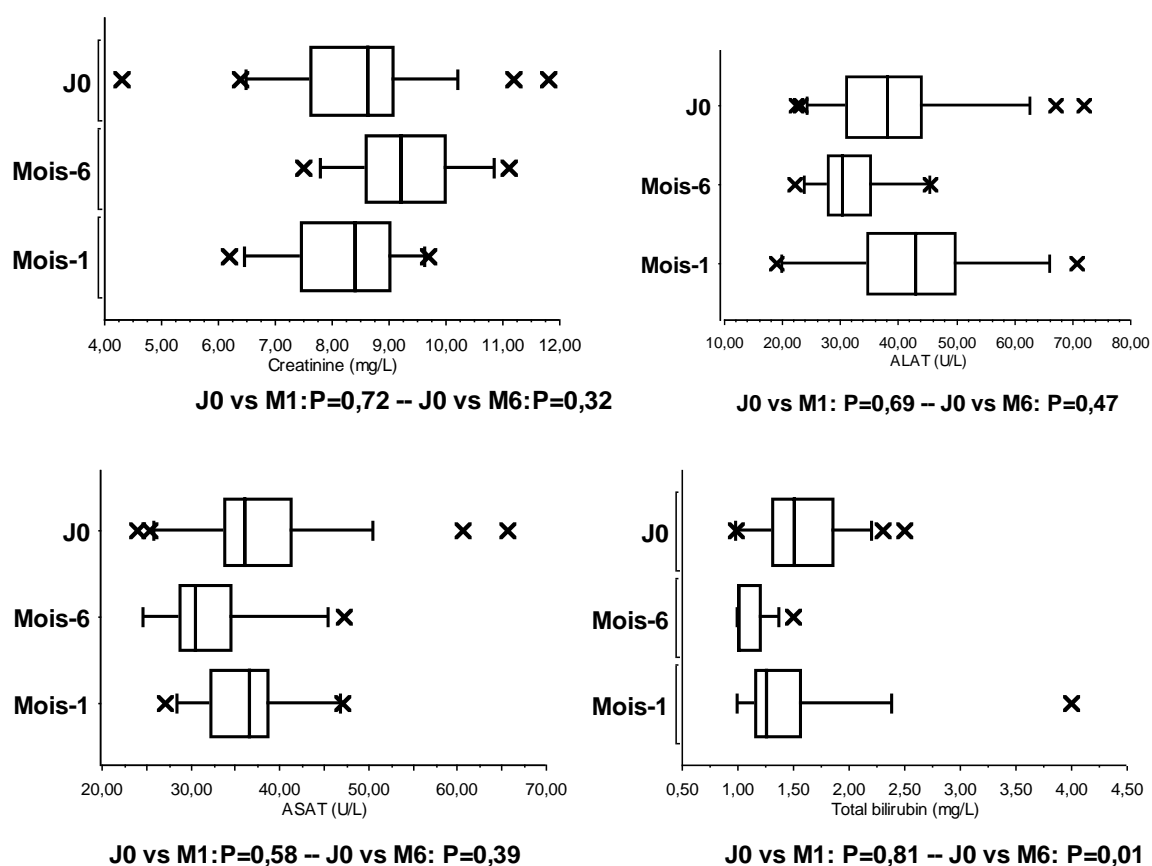


Figure 47 : Résultats biologiques avant l'implantation, à 1 mois et à 6 mois post-implantation (les valeurs de P étaient déterminées par le test de rang de Wilcoxon).



Figure 48 : Aspect macroscopique de reins 6 mois après implantation de PLM-CD

L'analyse des données macroscopiques obtenues lors des nécropsies réalisées (Tableau 5) montre que les prothèses PLM et PLM-CD étaient, à 1 mois et à 6 mois, bien tolérées localement chez tous les animaux implantés.

Tableau 5 : Critères macroscopiques de cicatrisation et de tolérance locale des prothèses vasculaires fonctionnalisées par le poly-CTR-HP β CD après 1 mois et 6 mois d'implantation dans un modèle canin.

	Score à 1-mois			Score à 6-mois		
	PLM	PLM-CD	PLM-CD+ATB	PLM	PLM-CD	PLM-CD+ATB
Erythème	0	0	0	0	0	0
Oedème	0	0-1	1-2	0	0	0
Sérome	0-2	0-2	1-2	0	0-2	0
Hémorragie	0-1	0-1	1-2	0-2	1-2	1-2
Néo vascularisation	1-2	1-2	1-2	1-2	0	0-1
Fibrose	2-3	2-3	2-3	1-2	1-2	1
Nécrose	0	0	0	0	0	0
Néo intima	0	0	0	1-2	0-1	1
Hyperplasie Tissulaire	0	0	0	0	0	0
Dilatation prothétique	0-2	0-2	1	0-1	0-1	0

Tous les pontages prothétiques étaient perméables à la fin du suivi et bien encapsulés (Figure 49). Nous avons noté à 6 mois la présence sur certains pontages des thrombi intra luminaux attribués à la disparité de calibre (Figure 49) entre les greffons prothétiques implantés de diamètre nominal égal à 6 mm et les artères carotidiennes plus petites. Le diamètre externe moyen des artères carotidiennes pontées était en effet de $4,4 \pm 0,4$ mm ; $3,9 \pm 0,2$ mm ; et $3,8 \pm 0,3$ mm ($P = ns$) du côté respectivement implanté d'une prothèse PLM, PLM-CD ou PLM-CD chargée d'antibiotiques. L'analyse microscopique complémentaire de ces thrombi n'a d'ailleurs pas révélé d'éléments compatibles avec une origine infectieuse ou autre, et aucune investigation complémentaire n'a donc été réalisée.

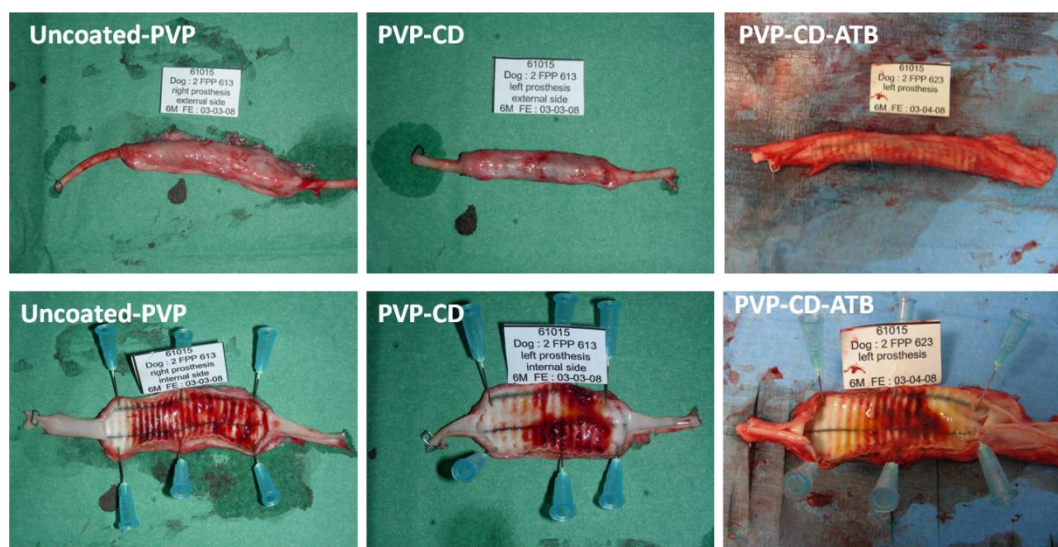


Figure 49 : Modèle canin : aspect macroscopique à l'explantation (haut : surface extérieure des implants —bas : surface endoluminale des implants au niveau des anastomoses.

Tous les chiens étaient encore vivants à la fin de la période de suivi correspondante pour être euthanasiés et explantés sauf un, implanté d'une PLM-CD d'un côté et d'une PLM-CD chargée avec de la RFP de l'autre qui était retrouvé mort à 4 mois.

Chez tous les chiens ayant été au bout de la période de suivi, l'examen histologique approfondi des sites d'implantation et des prothèses n'a pas révélé d'altérations tissulaires, sub-aigues (1-mois, Tableau 6) ou chroniques (6-mois, Tableau 7), indiquant une quelconque toxicité sub-aigue ou chronique de PLM-CD chargée ou non avec des molécules antibiotiques.

Tableau 6 : Données semi quantitatives de l'analyse histologique réalisée un mois après implantation chez le chien de PLM et PLM-CD.

	PLM	PLM-CD	PLM-CD+ATB
Fibrine	1-2	1-2	1-2
Perméabilité	4	4	4
Thrombus	0	0	0
Nécrose	0	0	0
Polymorphonucléaires	0-1	0-1	0-2
Lymphocytes	0-1	0-1	0-1
Plasmocytes	0	0	0
Macrophages	2	2	2
Cellules géantes	1	1	1
Fibroblastes	1	1	1-2
Fibrose périprothétique	1	1	1-2
Néo vascularisation	1	1	1
Calcification	0	0	0
Dégradation de l'Implant	0	0	0
Cellules endothéliiformes	1	1	1
Epaisseur du Neointima	1	1	1
Hyperplasia Myointimale	1-2	1-2	1
Intégration tissulaire	1	1	1

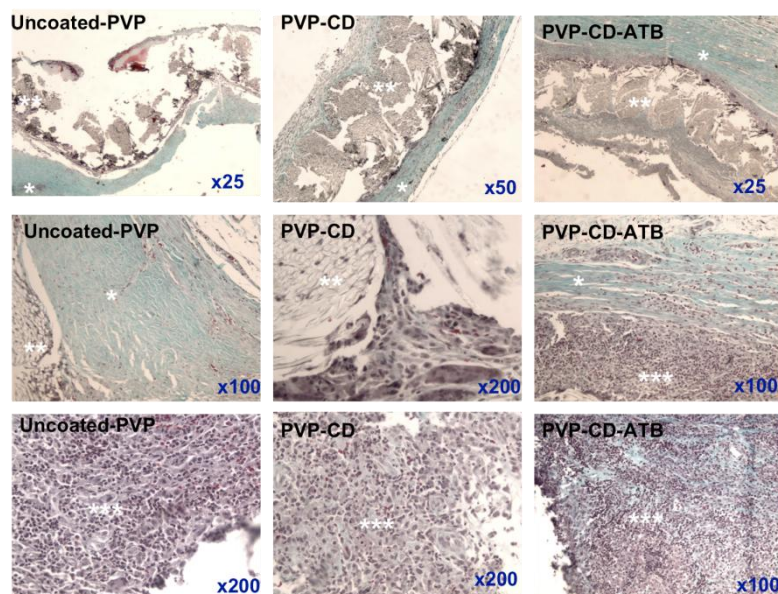


Figure 50 : Aspects histologiques à un mois (PVP = prosthèse vasculaire en polyester ; CD = cyclodextrine ; ATB = antibiotiques)

Haut: site anastomotique; milieu: tissus fibreux péri prothétiques; bas: infiltrat inflammatoire autour de la prothèse. Coloration de trichrome Masson, microscopie optique: * prolifération de fibroblastes; ** matériel prothétique; *infiltrat inflammatoire dense (Nombreux PMN et très peu de monocytes.**

Un infiltrat inflammatoire et du tissu fibreux étaient notés à 1 mois (Figure 50) autour de toutes les prothèses implantées (PLM, PLM-CD, PLM-CD+ATB) mais sans différence majeure entre les groupes (Tableau 6).

Tableau 7 : Données semi quantitatives de l'analyse histologique réalisée 6 mois après implantation chez le chien de PLM et PLM-CD.

	PVP	PVP-CD	PVP-CD+ATB
Fibrine	1-2	0-2	0-1
Perméabilité	2-4	2-4	2-4
Thrombus	0-2	0-2	0-2
Nécrose	0	0	0
Polymorphonucléaires	0-1	0-1	0-1
Lymphocytes	0-1	0	0-1
Plasmocytes	0	0	0-1
Macrophages	1-2	1-2	1-2
Cellules géantes	0-1	1-2	1
Fibroblastes	2	2	1-2
Fibrose périprothétique	2	2	2
Néo vascularisation	1	1	1
Calcification	0	0	0
Dégradation de l'Implant	0	0	0
Cellules endothéliiformes	2	1-2	2-3
Epaisseur du Neointima	2	1-2	1-2
Hyperplasia Myointimale	1	1-2	1-2
Intégration tissulaire	2-3	2-3	2-3

A 6-mois, un certain degré d'hyperplasie myointimale (Figure 51) allant de léger à modéré était noté au niveau des anastomoses avec les prothèses PLM-CD chargées ou non en antibiotiques contre un grade léger pour les prothèses PLM (Tableau 7).

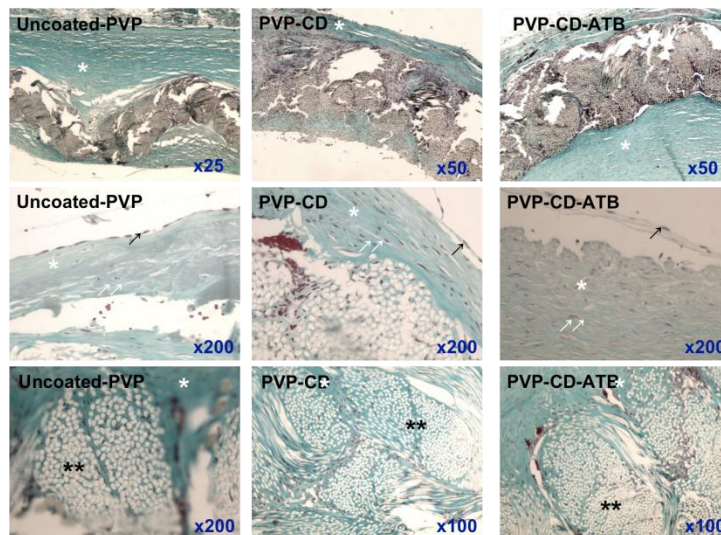


Figure 51 : Aspects histologiques à 6 mois : (PVP = prosthèse vasculaire en polyester; CD = cyclodextrine ; ATB = antibiotiques)

Coloration de Masson Trichome, microscopie optique: haut, site d'implantation; milieu, hyperplasie myointimale avec quelques cellules endothéliformes éparées; bas, intégration tissulaire; (*fibroblastes; ** matériel prothétique; ↑ cellules endothéliformes; ↗↗ cellules musculaires lisses.

Chez le seul chien décédé avant la fin de la période de suivi dédiée, l'histologie post-mortem montra : une nécrose focale hémorragique sévère au niveau du cerveau, des signes de cholestase hépatique multifocale, une hyperplasie pulpaire splénique et au niveau des deux sites d'implantation un infiltrat péri prothétique de polymorphonucléaires neutrophiles. Toutes ces trouvailles semblaient compatibles avec un état intercurrent de sepsis chronique causé par un *Staphylococcus aureus* multirésistant découvert sur les examens bactériologiques post-mortem complémentaires. Pour mémoire, cette souche staphylococcique fut trouvée seulement sensible à l'Enrofloxacin, une quinolone ayant une structure semblable à la CFX.

4.3.4 Efficacité antibactérienne de PLM-CD chargée d'antibiotiques

4.3.4.1 Propriétés anti-adhésion bactérienne *in vitro*

Dans le but de déterminer la capacité des prothèses enrobées du poly-CTR-HPβCD à résister à l'adhésion bactérienne, nous avons évalué *in vitro* au bout de 15 minutes d'incubation les taux d'adhésion des bactéries Gram positif et des bactéries Gram négatif sur des échantillons de PLM-CD chargée en antibiotiques (RFP, CFX ou VCY). Les échantillons de PLM servaient de témoins et étaient réputés avoir un taux d'adhésion de 100%.

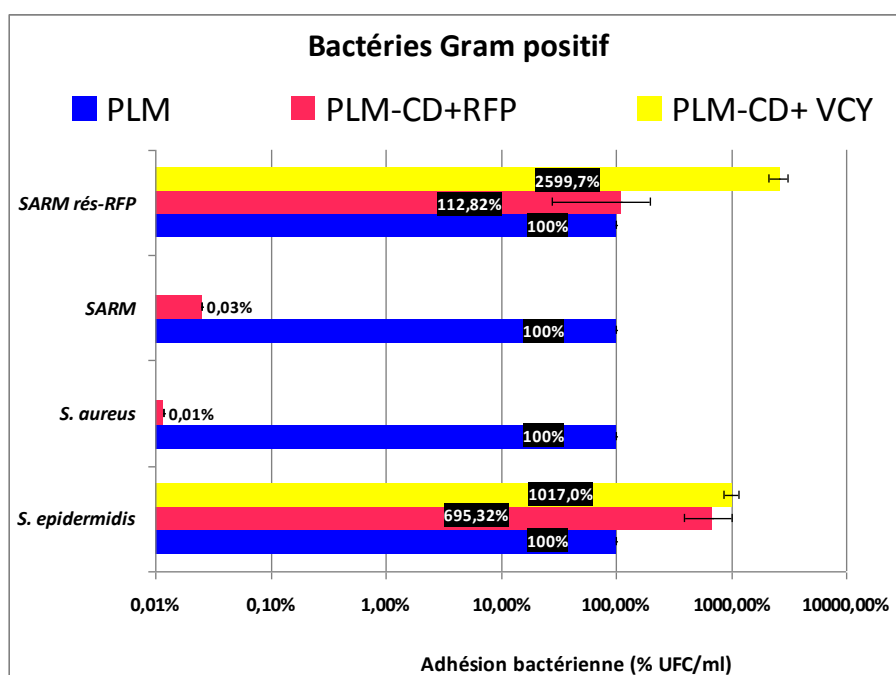


Figure 52 : Taux d'adhésion (échelle logarithmique) *in vitro* des bactéries Gram (+) après 15' d'incubation sur PLM et sur PLM-CD + antibiotiques : Rifampicine (RFP), Vancomycine (VCY). *S. aureus* méti-R (SARM) ; SARM et résistant à la rifampicine (SARM rés-RFP)

La Figure 52 montre le taux d'adhésion des bactéries Gram positif après 15 minutes d'incubation à 37°C. La réponse bactérienne était différente suivant les espèces évaluées et suivant les antibiotiques utilisés pour la fonctionnalisation prothétique. Le taux d'adhésion de *S. aureus* méti-S était significativement abaissé ($> 4\log_{10}$ %UFC/ml) sur PLM-CD chargée de RFP ($P=0,04$; test de Mann Whitney). De même, il existait une réduction significative ($P=0,04$; test de Mann Whitney) de l'adhésion de *S. aureus* méti-R sur les supports PLM-CD chargés de RFP comparés à PLM. Le taux d'adhésion de *S. epidermidis* était équivalent sur PLM-CD chargée de RFP et sur PLM-CD chargée de VCY ($P=0,13$). Paradoxalement, *S. epidermidis* avait en 24 heures proliféré de manière significative sur ces deux supports: 695% ($P=0,01$) et 1017% ($P=0,004$) respectivement comparés à PLM (ANOVA et correction de Bonferroni-Dunn). Concernant la souche de *S. aureus* méti-R qui était aussi résistante à la RFP (ResRFP-SARM), il n'y avait pas comme attendu de différence entre son taux d'adhésion sur PLM-CD chargée de RFP et celui sur le témoin PLM ($P=0,95$). En revanche, cette bactérie avait paradoxalement proliféré sur les échantillons de PLM-CD chargés de VCY comparés au témoin PLM ($P<0,0001$) ou comparés à PLM-CD chargée de RFP ($P<0,0001$; ANOVA et correction de Bonferroni-Dunn).

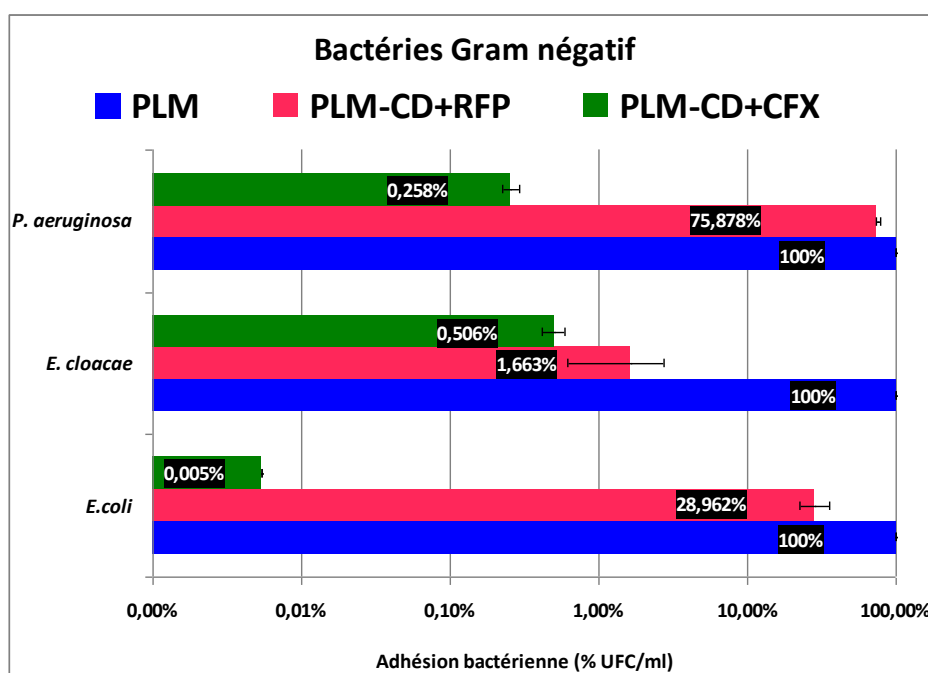


Figure 53 : Taux d'adhésion (échelle logarithmique) *in vitro* des bactéries Gram (-) après 15' d'incubation sur PLM et PLM-CD + antibiotiques (N=3): Rifampicine (RFP), Ciprofloxacin (CFX).

Concernant les bactéries Gram négatif, le taux d'adhésion de *E. coli* était très abaissé sur PLM-CD chargée de CFX comparée au témoin PLM ($>4\log_{10}$ %UFC/ml ; $P<0,0001$) ou à PLM-CD chargée de RFP ($>3\log_{10}$ %UFC/ml ; $P<0,0001$). Contre *E. cloacae*, une réduction significative du taux d'adhésion était aussi obtenue avec les échantillons PLM-CD chargés de CFX ($>2\log_{10}$ %UFC/ml; $P<0,0001$) ou chargés de RFP ($>1\log_{10}$ %UFC/ml; $P<0,0001$) en comparaison avec le taux d'adhésion sur PLM. *P. aeruginosa* adhérait aussi moins facilement sur les échantillons de PLM-CD chargée de CFX (0,26%) que sur les échantillons de PLM-CD chargée de VCY (76%) ou que sur le témoin PLM ($P<0,0001$; ANOVA et correction de Bonferroni-Dunn).

4.3.4.2 Inhibition de la croissance bactérienne *in vitro*

Au cours de ces expériences nous avons déterminé *in vitro* l'efficacité au cours du temps des antibiotiques libérés à partir de prothèses PLM-CD fonctionnalisées avec RFP, VCY ou CFX. Le halo d'inhibition obtenu à partir de PLM (témoin) ou de PLM-CD + antibiotiques placés en désorption dans le plasma humain fut mesuré tous les jours pendant 7 jours par le test de diffusion contre sept espèces bactériennes différentes.

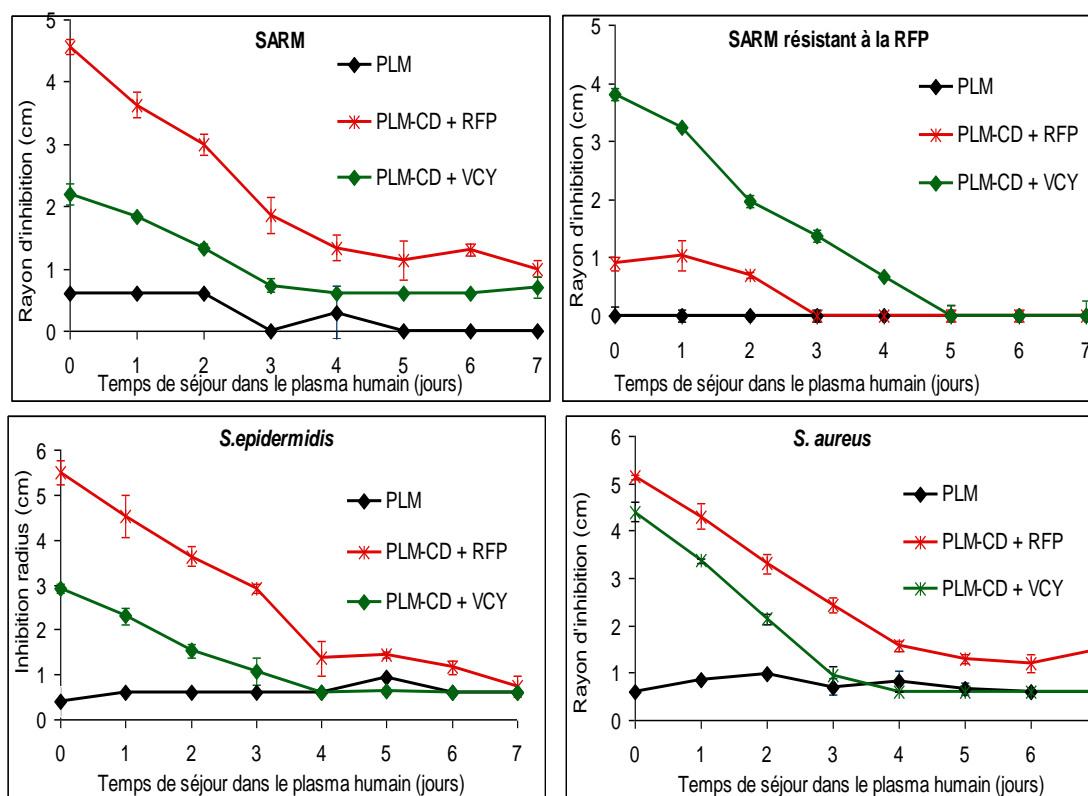


Figure 54 : Activité antibactérienne en fonction du temps (N=3) de PLM-CD + antibiotiques (RFP ou VCY) versus PLM (témoin) contre 4 bactéries Gram (+).

Valeurs de P par ANOVA suivie de Bonferroni-Dunn (Significativité si $P \leq 0,01$).

***S. epidermidis* :** PLM vs PLM-CD + RFP $\rightarrow P < 0,0001$; PLM vs PLM-CD + VCY $\rightarrow P = 0,03$; PLM-CD + RFP vs PLM-CD + VCY $\rightarrow P = 0,0001$.

***S. aureus* :** PLM vs PLM-CD + RFP $\rightarrow P < 0,0001$; PLM vs PLM-CD + VCY $\rightarrow P = 0,005$; PLM-CD + RFP vs PLM-CD + VCY $\rightarrow P = 0,02$.

SARM : PLM vs PLM-CD + RFP $\rightarrow P < 0,0001$; PLM vs PLM-CD + VCY $\rightarrow P = 0,002$; PLM-CD + RFP vs PLM-CD + VCY $\rightarrow P < 0,0001$.

SARM résistant à la RFP : PLM vs PLM-CD + RFP $\rightarrow P = 0,2$; PLM vs PLM-CD + VCY $\rightarrow P < 0,0001$; PLM-CD + RFP vs PLM-CD + VCY $\rightarrow P < 0,0001$.

La Figure 54 montre la cinétique de l'efficacité antibactérienne de ces échantillons au fil de leur désorption dans le plasma contre les bactéries Gram positif : *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. aureus* méti-R (SARM) et *S. aureus* méti-R et résistant à la RFP. Le matériel témoin (PLM) comme attendu n'inhiba la croissance d'aucune des espèces bactériennes testées. PLM-CD chargée de RFP démontra une activité déclinante mais soutenue jusqu'au 7^{ème} jour contre la croissance et la prolifération bactériennes de *S. epidermidis*, de *S. aureus* et de SARM sensible à la RFP. La souche de SARM résistante à la RFP s'est montrée vulnérable à l'action des échantillons PLM-CD + VCY jusqu'à leur 4^{ème} jour de désorption dans le plasma humain mais a proliféré comme attendu sur les échantillons de PLM-CD + RFP (Figure 54). A noter que PLM-CD chargée de VCY démontra aussi jusqu'à 48 heures une activité contre les autres bactéries Gram positif testées (*S. aureus*, *S. epidermidis* et SARM) mais inférieure à celle de PLM-CD chargée de RFP.

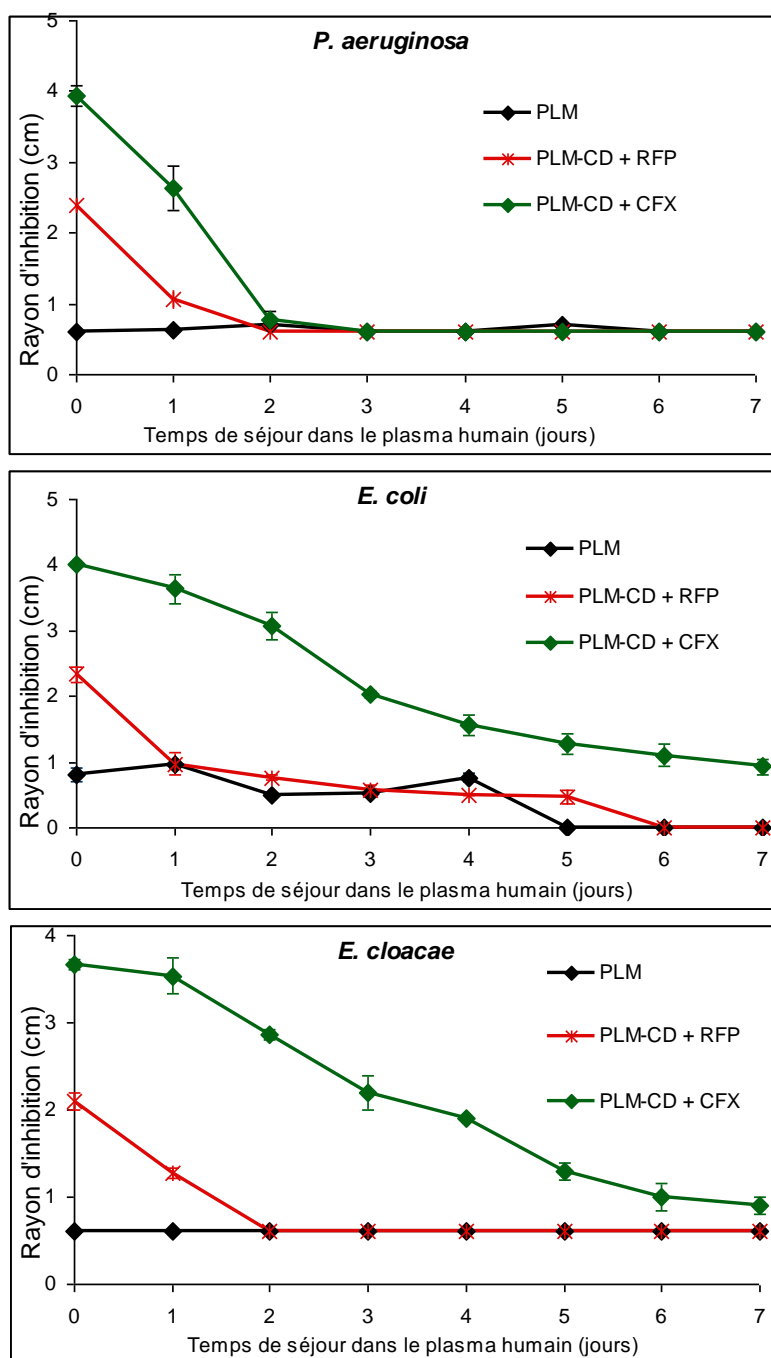


Figure 55 : Activité antibactérienne à travers le temps (N=3) de PLM-CD + antibiotiques (RFP ou CFX) versus PLM (témoin) contre 3 bactéries Gram (-).

Valeurs de P par ANOVA suivie de Bonferroni-Dunn (Significativité si $P \leq 0,01$).

***E. coli* :** PLM vs PLM-CD + RFP $\rightarrow P=0,28$; PLM vs PLM-CD + CFX $\rightarrow P<0,0001$; PLM-CD + RFP vs PLM-CD + CFX $\rightarrow P<0,0001$.

***E. cloacae* :** PLM vs PLM-CD + RFP $\rightarrow P=0,14$; PLM vs PLM-CD + CFX $\rightarrow P<0,0001$; PLM-CD + RFP vs PLM-CD + CFX $\rightarrow P<0,0001$.

***P. aeruginosa* :** PLM vs PLM-CD + RFP $\rightarrow P=0,21$; PLM vs PLM-CD + CFX $\rightarrow P=0,008$; PLM-CD + RFP vs PLM-CD + CFX $\rightarrow P=0,13$.

Concernant les bactéries Gram négatif (*E. coli*, *E. cloacae* et *P. aeruginosa*) nous n'avons détecté aucune activité de PLM (dès le début) ou de PLM-CD chargée de RFP au-delà des 24 premières heures (Figure 55). PLM-CD chargée de CFX était hautement efficace contre *E.*

coli et *E. cloacae* même parvenue au 7^{ème} jour de désorption dans le plasma humain. Quoique très élevée au départ l'efficacité de PLM-CD chargée de CFX s'est très rapidement amendée (<48 heures) contre *P. aeruginosa* (Figure 55).

4.3.4.3 Propriétés antibactériennes *in vivo*

Dans le but de déterminer l'efficacité du concept *in vivo*, des prothèses vasculaires PLM et PLM-CD chargée d'antibiotiques (RFP, CFX, VCY) ont été implantées dans le modèle murin de contamination bactérienne. La charge bactérienne moyenne utilisée pour l'inoculation des échantillons implantés (pastilles de 6 mm de diamètre) était de $3,63 \times 10^7 \pm 2,53$ UFC/ml. Il n'y avait aucun décès postopératoire sur les 84 souris implantées.

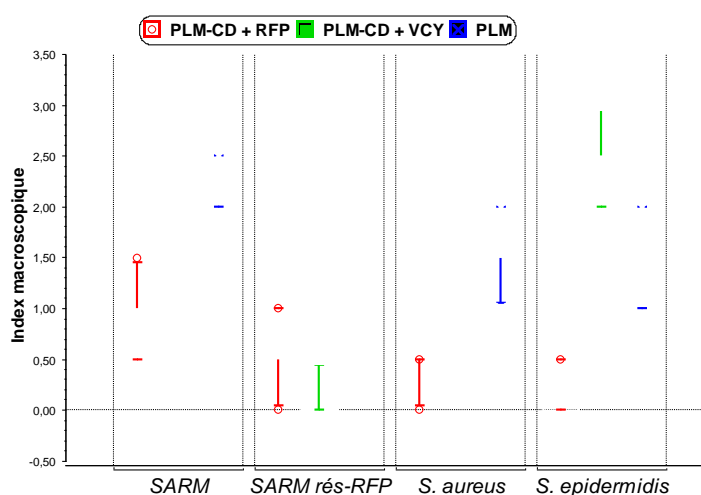


Figure 56 : Boîte à moustaches représentant le score de sévérité des signes cliniques locaux d'infection chez la souris lors de l'explantation des prothèses implantées en sous-cutané et inoculées avec des bactéries Gram positif (N=6).

Les observations macroscopiques réalisées à l'explantation des échantillons sont résumées dans les Figure 56 (bactéries Gram positif) & Figure 57 (bactéries Gram négatif) suivant la sévérité des signes locaux d'infection observés chez la souris au 7^{ème} jour après l'inoculation.

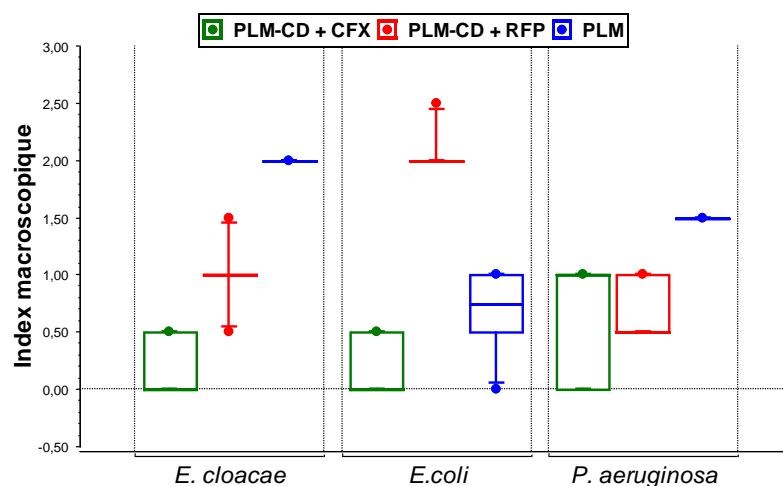


Figure 57 : Boite à moustaches représentant le score de sévérité des signes cliniques locaux d'infection chez la souris lors de l'explantation des prothèses implantées en sous-cutané et inoculées avec des bactéries Gram négatif (N=6).

Toutes les souris implantées des prothèses témoins (PLM) présentaient des signes locaux plus ou moins évidents d'infection sauf dans les groupes inoculés par *E. coli* et par la souche de SARM résistante à la RFP. Les prothèses imprégnées de RFP étaient associées à des index macroscopiques d'infection très faibles dans les modèles de contamination par des bactéries Gram positif. Les bactéries Gram négatif déclenchaient en revanche chez la souris des signes manifestes d'infection en présence de PLM-CD chargée de RFP. L'index macroscopique chez les souris implantées de PLM-CD chargée de CFX était à l'inverse très abaissé lors des contaminations par ces bactéries Gram négatif. La Figure 58 et la Figure 59 présentent les résultats quantitatifs des examens bactériologiques réalisés sur les différents explants prothétiques.

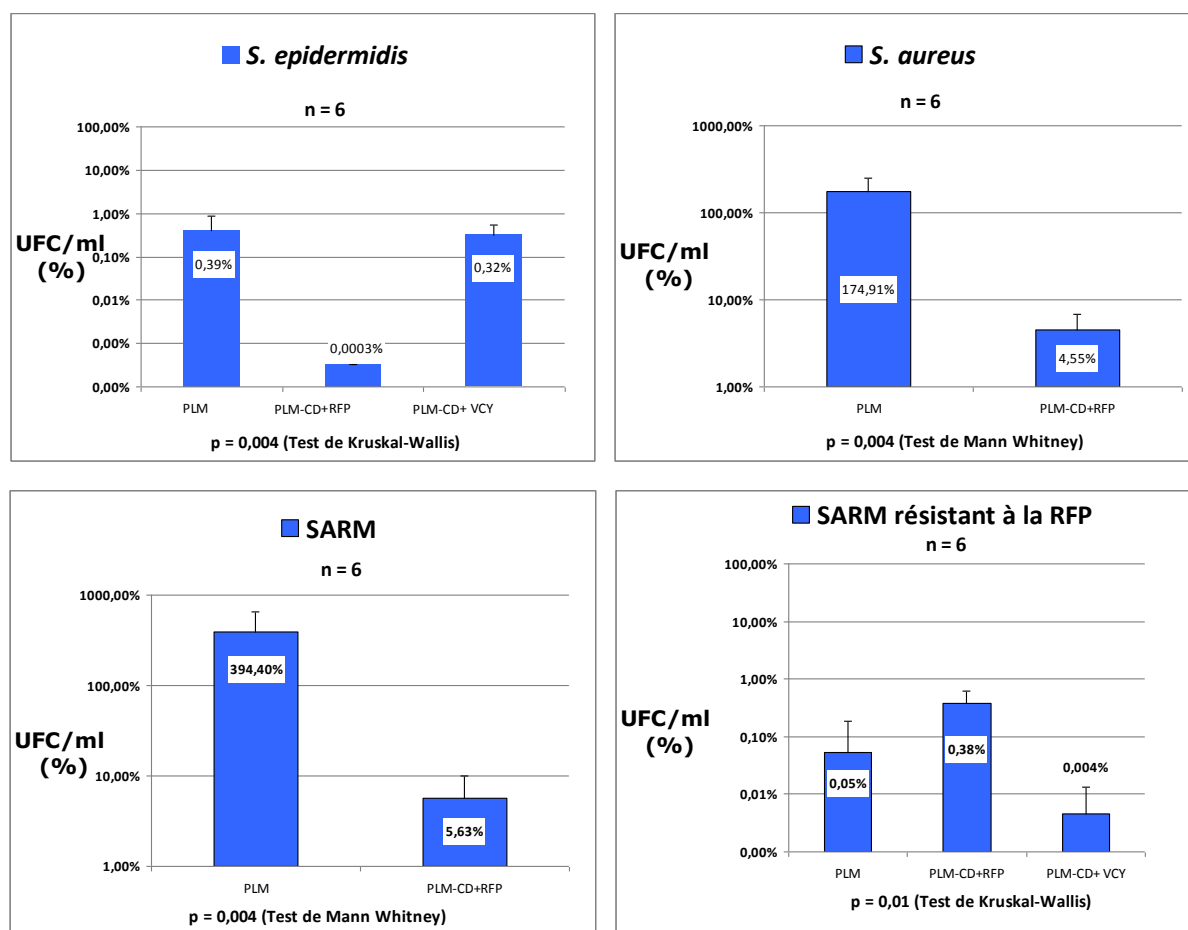


Figure 58 : Résultats quantitatifs (% de l'inoculum bactérien) sur une échelle logarithmique des bactéries présentes sur les prothèses (PLM vs PLM-CD + RFP ou + VCY) implantées en sous cutané chez la souris au 7^{ème} jour après l'inoculation par des bactéries Gram positif.

Les signes cliniques locaux d'infection concordaient de manière générale avec les résultats des examens bactériologiques réalisés sur ces échantillons explantés. Concernant les bactéries Gram positif (Figure 58), *S. epidermidis* était au 7^{ème} jour après son inoculation sous le seuil de détection au niveau des prothèses PLM-CD chargées de RFP. Il y avait comparativement $3\log_{10}$ (%UFC/ml) de plus de *S. epidermidis* sur PLM ou sur PLM-CD chargée de VCY, avec pour certaines souris des signes macroscopiques évidents d'infection (Figure 56). En ce qui a trait à *S. aureus*, il n'y avait à l'analyse macroscopique aucun signe local évident d'infection dans le groupe de souris implanté avec PLM-CD chargée de RFP. L'analyse bactériologique montra sur les explants PLM-CD chargée de RFP un taux faible (4,55%) de bactéries encore présentes contre un taux de 175% sur PLM concordant avec une prolifération bactérienne *in vivo*. Contre le SARM (Figure 58), une réduction significative du nombre de bactéries résiduelles présentes sur les échantillons de PLM-CD chargée de RFP (5,6%) était également observée à 7 jours de l'implantation contrairement à PLM où il y a eu une prolifération

bactérienne importante (394%). Ce qui concordait avec les résultats (Figure 56) de l'analyse macroscopique ayant également objectivé des signes locaux évidents d'infection sur PLM contaminée par le SARM. Comme anticipé, la souche de SARM résistante à la RFP n'a pas répondu *in vivo* aux échantillons de PLM-CD chargée de RFP mais était au 7^{ème} jour après son inoculation sous le seuil de détection avec les échantillons PLM-CD chargée de VCY (0,004%) soit une réduction de $2\log_{10}$ (%UFC/ml) comparée à PLM. A noter que nous n'avions pas testé les échantillons PLM-CD chargée de VCY contre *S. aureus* ni contre le SARM sensible à la RFP.

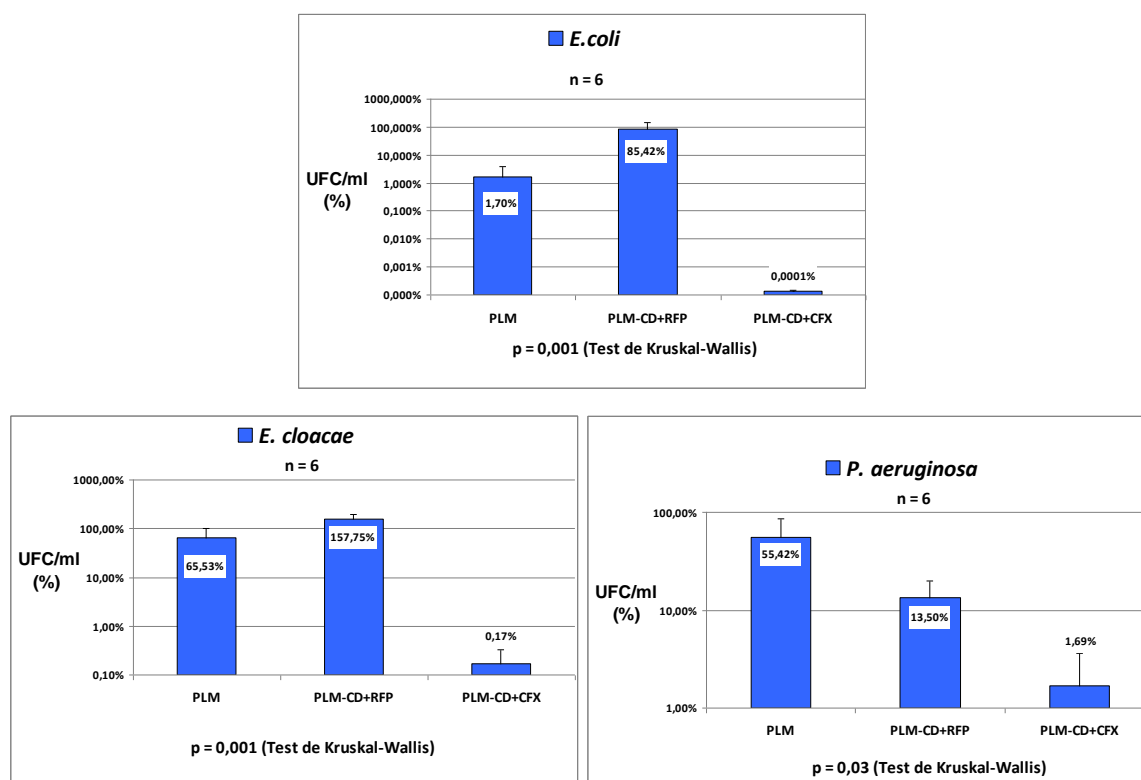


Figure 59 : Résultats quantitatifs (% de l'inoculum bactérien) sur une échelle logarithmique des bactéries présentes sur les prothèses (PLM vs PLM-CD + RFP ou + CFX) implantées en sous cutané chez la souris au 7^{ème} jour de l'inoculation par des bactéries Gram négatif.

En ce qui a trait aux bactéries Gram négatif (Figure 59), PLM-CD chargée de RFP était comme PLM complètement inefficace (Figure 59). PLM-CD chargée de CFX amena *E. coli* sous le seuil de détection (0,0001% de bactéries résiduelles), soit une réduction de plus de $5\log_{10}$ (%UFC/ml) comparée à PLM-CD chargée de RFP ou de $3\log_{10}$ (%UFC/ml) comparée au témoin PLM. Les échantillons PLM-CD chargée de CFX provoquèrent également une diminution drastique du nombre de bactéries *E. cloacae* résiduelles sur le support prothétique (0,17%) par comparaison aux échantillons de PLM-CD chargée de RFP (158%), soit au 7^{ème} jour post inoculation une réduction de plus de $3\log_{10}$ (%UFC/ml). Contre *P. aeruginosa*,

l'action de PLM-CD chargée de CFX était moins manifeste (1,69% de bactéries résiduelles) aboutissant à une réduction de plus ou moins $1\log_{10}$ (%UFC/ml) seulement comparée à PLM-CD chargée de RFP.

4.3.5 Activation de PLM-CD par une association d'antibiotiques

4.3.5.1 Capacité différentielle d'adsorption en antibiotiques

Au cours de cette expérience, nous avons déterminé la quantité différentielle d'antibiotiques captée par les prothèses PLM et PLM-CD après 25 minutes d'imprégnation dans une solution mixte de deux antibiotiques différents : RFP 12 gL^{-1} / CFX 2 gL^{-1} ; RFP 12 gL^{-1} / VCY 10 gL^{-1} ; et VCY 10 gL^{-1} / CFX 2 gL^{-1} . La Figure 60 montre les résultats du dosage spectrophotométrique réalisé sur ces différents échantillons après désorptions successives dans le méthanol puis dans la soude.

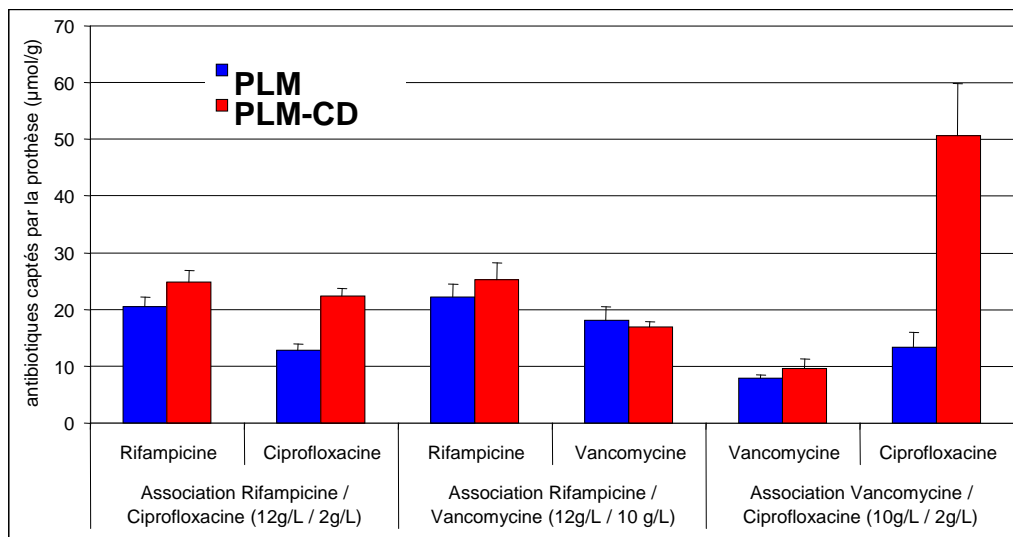


Figure 60 : Quantité d'antibiotiques absorbée par PLM et PLM-CD après imprégnation pendant 25 minute (n=6) dans une solution contenant 2 antibiotiques associés en solution : Rifampicine (12 g/L), vancomycine (10 g/L) et ciprofloxacin (2 g/L)

Il y avait (Figure 60) une quantité équivalente d'antibiotiques captée par les deux prothèses dans le cas de l'association RFP / VCY. Dans le cas des deux autres associations, une quantité plus importante d'antibiotiques était captée par la PLM-CD comparée à la PLM. La PLM-CD capta toutefois la CFX essentiellement dans le cas de l'association VCY/ CFX.

4.3.5.2 Interactions ciprofloxacin/rifampicine en solution

Dans le but de déterminer les interactions entre la CFX et la RFP en solution mixte pour rendre actives des prothèses fonctionnalisées par le poly-CTR-HPβCD, une solution de CFX à

16 mg/L, une solution de RFP à 20 mg/L et une solution associant la CFX à la RFP aux concentrations respectives de 16 mg/L et de 20 mg/L ont été préparées. Les trois solutions ont été analysées au spectrophotomètre UV (Figure 61).

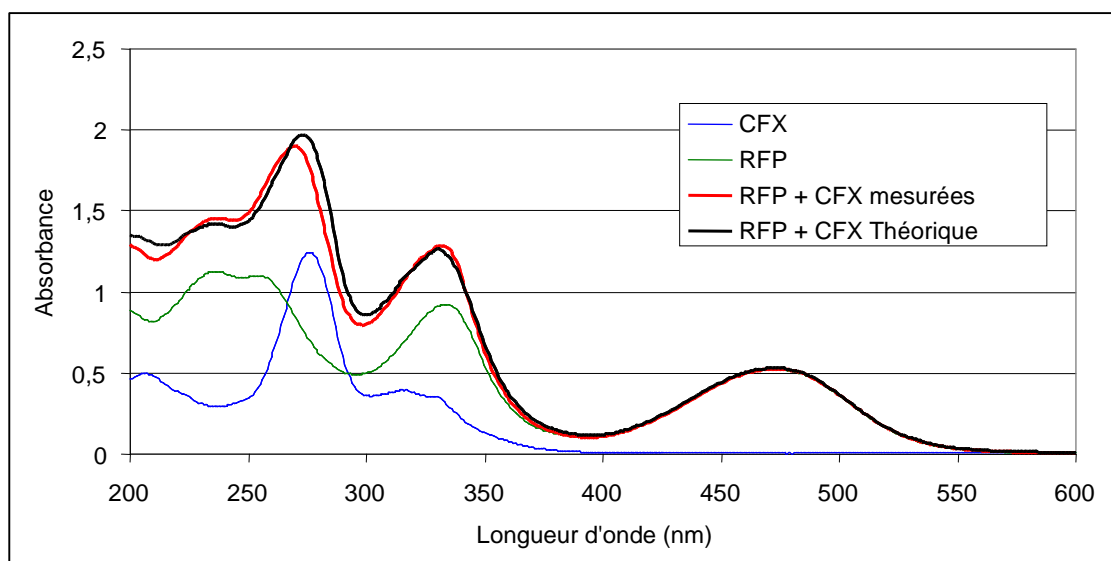


Figure 61 : Etude spectrophotométrique de la ciprofloxacine (CFX, 16 mg/L), de la rifampicine (RFP, 20 mg/L) et d'une solution mixte associant RFP (20 mg/L) et CFX (16 mg/L).

L'étude dynamique de l'absorbance de ces 3 solutions en fonction d'une gamme étendue de longueurs d'onde suggérerait l'absence de formation de nouveaux produits. La Figure 61 montre bien en effet que la courbe théorique (somme des deux spectres de la CFX (16 mg/L) et de la RFP (20 mg/L)) était très proche de la courbe expérimentale avec un très léger décalage du pic à 280 nm. Il n'y a eu aucune apparition ni disparition de pic due à cette association, qui pourrait suggérer la formation d'un nouveau produit. Une solution mixte de RFP/CFX devrait pouvoir conserver les activités antibactériennes de la CFX ainsi que celles de la RFP. Ces données nécessitent néanmoins confirmation par des techniques de caractérisation plus approfondie telles la RMN ou la spectrométrie de masse.

4.3.5.3 Efficacité de PLM-CD chargée de rifampicine/ciprofloxacine

4.3.5.3.1 Activité contre l'adhésion bactérienne (*in vitro*)

La Figure 62 montre le taux d'adhésion bactérienne sur PLM-CD chargée d'une solution mixte de RFP 60 gl^{-1} et de CFX 2 gl^{-1} sur une bactérie Gram positif, le SARM et sur une bactérie Gram négatif, l'*E. coli*. La PLM et la PLM-CD chargée de RFP ou de CFX seule étaient utilisées comme témoins. La taille de l'inoculum bactérien était de $5,04 \times 10^8 \pm 54,7 \times 10^{-1}$ UFC/ml.

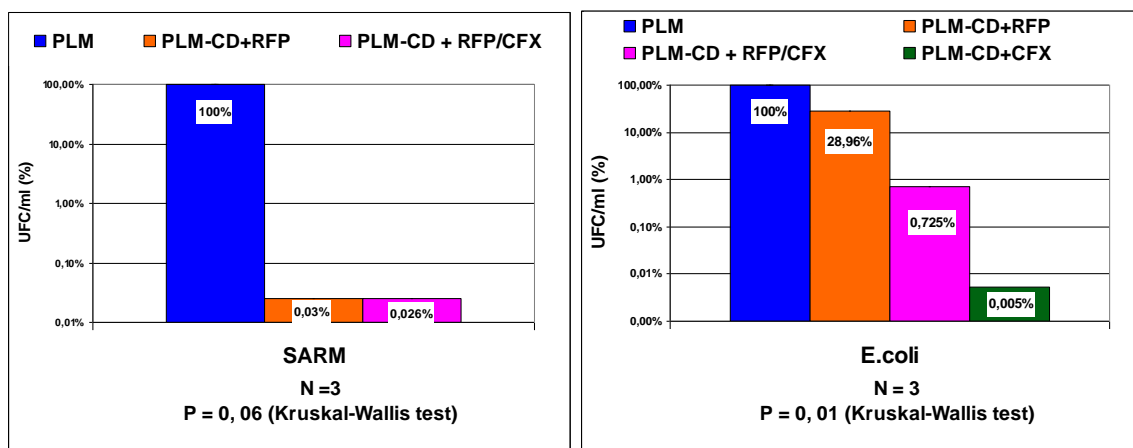


Figure 62 : Taux d'adhésion (échelle logarithmique) *in vitro* de SARM et de *E. coli* après 15' d'incubation sur PLM et sur PLM-CD chargée d'antibiotiques : RFP, CFX ou l'association RFP+CFX.

Contre le SARM la performance des échantillons de PLM-CD chargée de l'association RFP/CFX était équivalente à celle des échantillons de PLM-CD chargée de RFP seule. PLM-CD chargée de RFP/CFX provoqua une chute drastique ($\geq 5 \log_{10}$ %UFC/ml) de l'adhésion de SARM comparée aux supports prothétiques PLM. Contre *E. coli*, l'association RFP/CFX apparut moins efficace que CFX seule mais plus efficace que RFP seule (Figure 62).

4.3.5.3.2 Activité contre la prolifération bactérienne (*in vitro*)

Les échantillons de PLM-CD chargée d'une association de RFP/CFX ont aussi démontré *in vitro* une réduction significative de la croissance bactérienne au cours du temps. Cet effet fut évalué par le test de diffusion, au fil de la désorption sur 7 jours des échantillons dans le plasma humain, contre deux souches bactériennes : *S. aureus* méti-R (SARM) et *E. coli*.

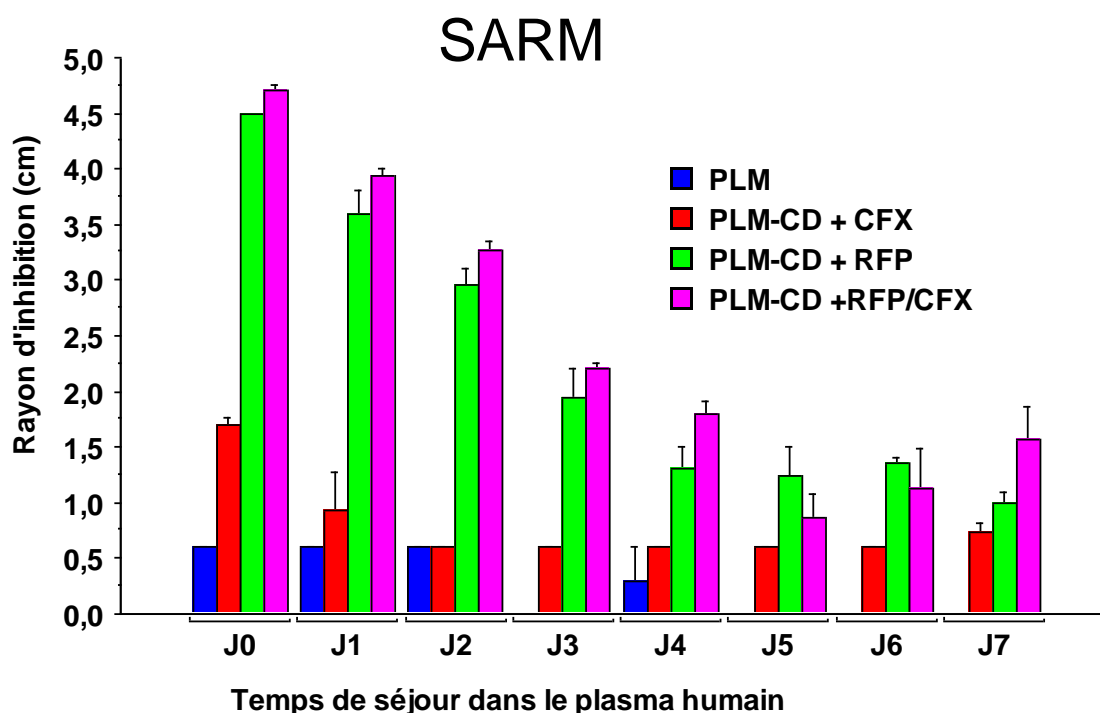


Figure 63 : Activité antibactérienne à travers le temps (N=3) de PLM-CD + antibiotiques (RFP, CFX ou RFP/CFX) versus PLM (témoin) contre SARM.

Valeurs de P par ANOVA suivie de Bonferroni-Dunn (Significativité si $P \leq 0,001$)

PLM, PLM-CD + CFX : ($P=0,0619$);

PLM, PLM-CD + RFP : $P < 0,0001$;

PLM, PLM-CD + RFP/CFX: $P < 0,0001$;

PLM-CD + CFX, PLM-CD + RFP : $P < 0,0001$;

PLM-CD + CFX, PLM-CD + RFP/CFX : $P < 0,0001$;

PLM-CD + RFP, PLM-CD + RFP/CFX : $P=0,5955$.

Contre le SARM (Figure 63), PLM-CD chargée de RFP/CFX montra une efficacité soutenue et significative jusqu'au septième jour comparable à l'action des échantillons PLM-CD chargés de RFP seule. Il n'y avait pas d'effet synergique ni d'antagonisme non plus dans l'efficacité de l'association RFP/CFX. PLM-CD chargée de CFX seule n'avait comme PLM démontré pour sa part aucune activité contre la prolifération de SARM.

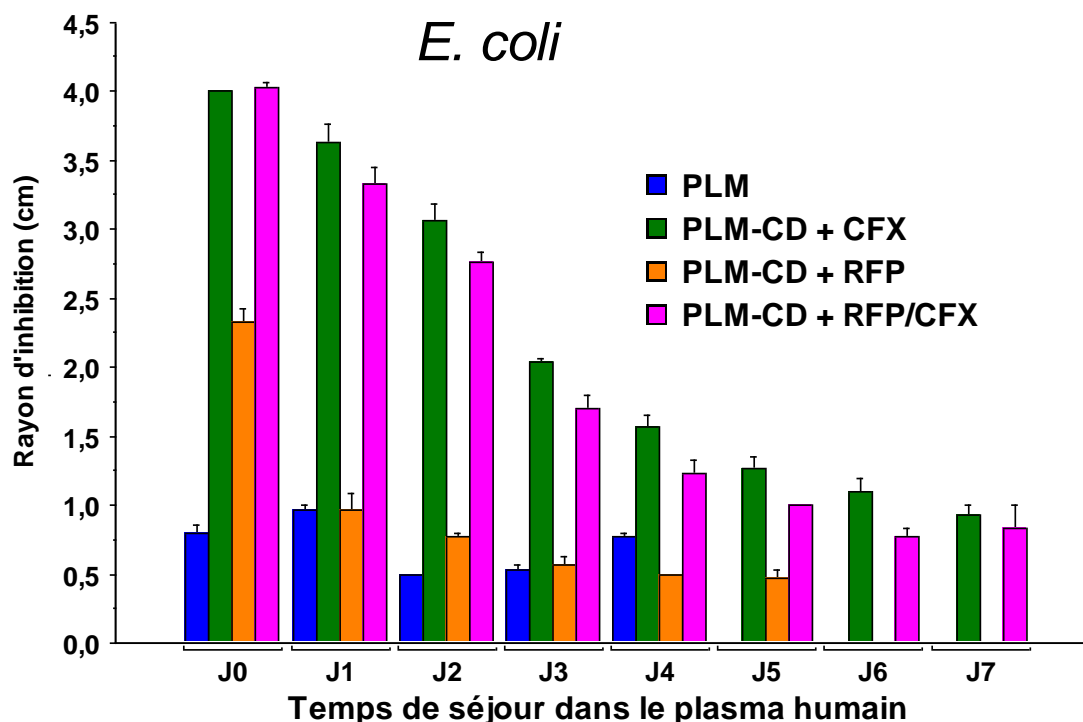


Figure 64 : Activité antibactérienne à travers le temps (N=3) de PLM-CD + antibiotiques (RFP, CFX ou RFP/CFX) versus PLM (témoin) contre *E. coli*.

Valeurs de P par ANOVA de Bonferroni-Dunn (Significativité si $P \leq 0,001$)

PLM, PLM-CD + CFX : $P < 0,0001$;

PLM, PLM-CD + RFP : $P = 0,3460$;

PLM, PLM-CD + RFP/CFX : $P < 0,0001$;

PLM-CD + CFX, PLM-CD + RFP : $P < 0,0001$;

PLM-CD + CFX, PLM-CD + RFP/CFX : $P = 0,3701$;

PLM-CD + RFP, PLM-CD + RFP/CFX : $P < 0,0001$.

Des résultats similaires ont été observés contre *E. coli* (Figure 64). PLM-CD chargée de CFX seule ou en association avec RFP démontrait une activité comparable, efficace et soutenue contre la croissance et la prolifération d'*E. coli* sur les supports prothétiques. Il n'y avait pas d'effet synergique ni d'antagonisme non plus dans l'efficacité de l'association RFP/CFX. PLM-CD chargée de RFP n'avait pas manifesté d'activité au-delà de la 24^{ème} heure de désorption dans le plasma humain (Figure 64).

4.3.5.3.3 Activité antibactérienne (*in vivo*)

Les résultats des deux expériences précédentes ont été confirmés *in vivo* dans le modèle murin de contamination bactérienne par SARM et par *E. coli* (Figure 65).

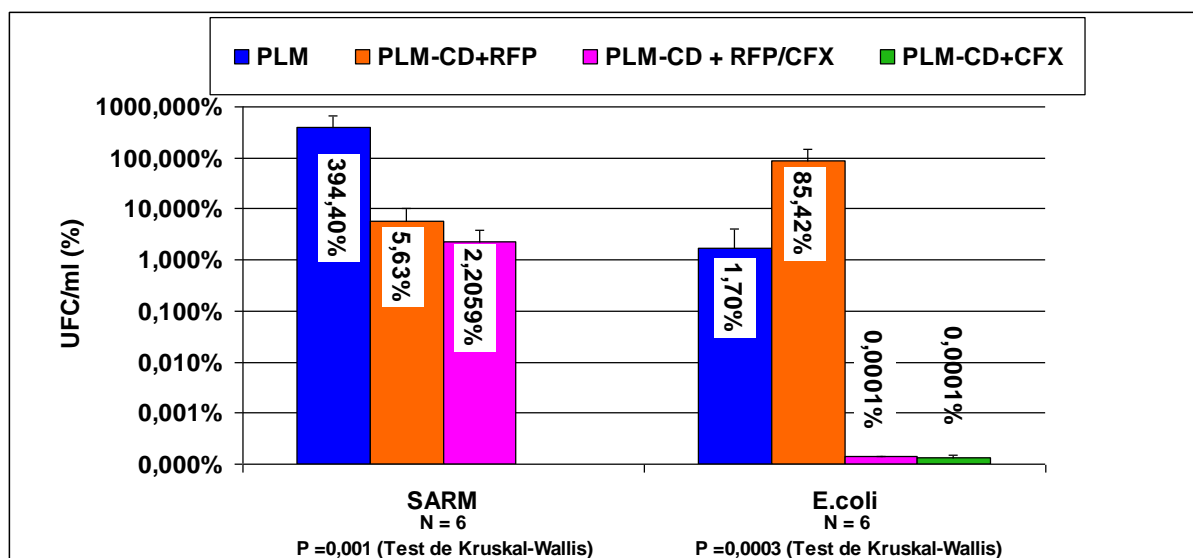


Figure 65 : Résultats quantitatifs (% de l'inoculum bactérien) sur une échelle logarithmique des bactéries SARM et *E. coli* présentes sur les prothèses PLM-CD + RFP/CFX vs PLM vs PLM-CD + (RFP ou CFX) implantées en sous cutané chez la souris au 7^{ème} jour post inoculation.

Contre le SARM et contre *E. coli*, l'activité antibactérienne de PLM-CD chargée de l'association RFP/CFX était aussi efficace que respectivement l'activité contre le SARM de PLM-CD chargée de RFP seule ou que celle contre *E. coli* de PLM-CD chargée de CFX seule. Ce qui confirme *in vivo* l'absence complète d'antagonisme et démontre la faisabilité d'associer deux antibiotiques différents sur le support PLM-CD en préservant l'activité de chacune d'entre elles.

4.4 Discussion

Au cours de ces expériences nous avons démontré qu'une modification des prothèses vasculaires en PET par l'adjonction d'un poly-CTR-HPβCD permettrait de capter par rapport au témoin jusqu'à 6 à 7 fois plus de certaines molécules antibiotiques comme la CFX. Ce qui concorde avec les données publiées antérieurement et obtenues par résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton et spectroscopie ROESY démontrant l'encapsulation de la CFX dans les cavités du poly-CTR-HPβCD (142). La CFX a la particularité de pouvoir former des complexes d'inclusion avec l'HPβCD comme démontré antérieurement (151, 152). La RFP a l'unique particularité de se lier assez facilement à la gélatine ou au collagène servant à étanchéifier les prothèses vasculaires en PET via des liaisons ioniques ou des ponts hydrogène. L'adjonction du polymère d'HβBCD n'a pas eu d'influence sur la quantité de RFP adsorbée sur PLM-CD par rapport à PLM et n'a pas ralenti significativement sa cinétique de libération dans le modèle USP4 de libération en flux continu. La RFP a des

interactions faibles avec la HP β CD qui certes sont difficilement détectables en spectroscopie ROESY (142) mais pouvant expliquer cette observation. Plusieurs études dans la littérature ont rapporté des données obtenues par RMN unidirectionnelle montrant l'encapsulation partielle dans la cavité de la HP β CD du groupe pipérazinyl de la RFP (153, 154). Il pourrait donc exister une diversité des sites d'adsorption de la RFP sur la prothèse fonctionnalisée par le poly-CTR-HP β CD. Dans le cas de certains antibiotiques ayant une affinité beaucoup plus faible avec le poly-CTR-HP β CD comme la VCY, la présence du polymère permet d'augmenter la quantité d'antibiotiques adsorbés sur le support en PET bien que cela fût dans des proportions (1,2 fois) inférieures à la CFX. La VCY par sa structure et son poids moléculaire ne peut pas être incluse dans les cages du poly-CTR-HP β CD mais comme la RFP, pourrait interagir avec différents sites d'adsorption sur les prothèses PLM-CD. L'augmentation nette de la quantité de VCY adsorbée par PLM-CD comparée à PLM pourrait être liée à des interactions complémentaires via des liaisons hydrogènes avec le poly-CTR-HP β CD. Ceci suggère qu'un large éventail d'antibiotiques, ne se limitant pas seulement à ceux capables de former des complexes d'inclusion avec HP β CD, pourra être adsorbé sur le PET ainsi fonctionnalisé.

Les expériences réalisées dans le modèle *in vitro* USP4 de libération en flux continu associées aux données bactériologiques obtenues lors des tests de diffusion confirment un mécanisme de libération prolongée, soutenue et contrôlée de principes actifs à partir des prothèses ainsi fonctionnalisées (PET avec un poly-CTR-HP β CD). Le temps d'imprégnation des prothèses (25 minutes) et la concentration de toutes les solutions antibiotiques utilisées ([CFX] : 2 g/L, [VCY] : 10 g/L, [RFP] : 12 g/L) restent accessibles en pratique clinique et seraient largement compatibles avec les pratiques opératoires actuelles dans le traitement ou la prévention des infections de prothèses vasculaires.

La sécurité des malades étant un sujet majeur de préoccupation lors de la conception de nouveaux excipients en pharmacologie (137), la littérature comporte de nombreuses références relatives à l'utilisation des cyclodextrines pour augmenter la biodisponibilité de médicaments administrés par voie orale (155). Nos résultats ont démontré l'innocuité et la biocompatibilité des prothèses vasculaires fonctionnalisées par un poly-CTR-HP β CD. Au cours des expériences conduites, Il n'y avait aucun signe de toxicité locale ni systémique. Les tests biologiques et les analyses histologiques n'ont montré aucun signe d'altération des fonctions rénale ou hépatique après implantation de ces prothèses chez l'animal. Ceci concorde avec les trouvailles des investigations les plus récentes sur les polymères de cyclodextrines ou sur les cyclodextrines conjuguées à des systèmes divers de libération

prolongée de principes actifs comme les nano particules et les liposomes ⁽¹⁵⁶⁾. La dégradation du poly-CTR-HPβCD évaluée par spectrométrie de masse a donné lieu d'une part à des citrates et d'autre part à des unités glucosidiques nullement toxiques pour l'homme ou les espèces animales. La PLM-CD était au bout du sixième mois après l'implantation dans un modèle canin de pontage artériel, comme le témoin PLM en usage clinique actuellement, bien intégrée dans les tissus environnants, sans aucune anomalie de cicatrisation. Le poly-CTR-HPβCD avait complètement disparu. Un infiltrat inflammatoire composé de monocytes et de polynucléaires neutrophiles était objectivé et était compatible avec une réaction inflammatoire allant de bas grade à modéré. Cette réaction serait tout à fait normale selon les données publiées antérieurement par Murphy et al et participerait au processus d'encapsulation des prothèses après leur implantation (157).

Une très légère différence était notée à 6 mois en ce qui a trait au degré d'hyperplasie myointimale entre la PLM-CD et le témoin PLM. Dans les deux cas il s'agissait de degrés d'hyperplasie myointimale dans des limites cliniquement tolérables. La présence de thrombus mural au niveau de certains pontages à 6 mois était beaucoup plus attribuée à la différence de calibre avec les artères carotidiennes pontées qu'à la thrombogénicité intrinsèque du matériel prothétique, d'autant qu'il n'y avait pas de différence entre la PLM-CD et le témoin PLM à cet égard. De façon similaire, les données histologiques avaient permis d'exclure une cause infectieuse en dépit du fait qu'aucune investigation microbiologique supplémentaire n'ait été entreprise sur ces thrombi.

En dépit d'une vigilance constante, de nombre de mesures générales ou de recommandations existantes pour limiter ou éviter à l'implantation la contamination des dispositifs médicaux, un nombre de plus en plus important de malades se présente chaque année avec des infections d'implant médical. La présence de matériels exogènes dans les tissus vivants semble compromettre significativement les facultés de l'hôte à résister au développement de microorganismes (158). Les stratégies appliquées par ces différents pathogènes pour envahir l'hôte ou pour s'attaquer au matériel exogène implanté sont bien connues. Elles incluent d'un côté l'adhésion, la pénétration et la prolifération bactériennes et de l'autre des dommages cellulaires ou tissulaires plus ou moins étendus provoqués par la seule présence bactérienne ou indirectement via les réactions immunitaires qu'elle déclenche (37). S'attaquer spécifiquement à chacun de ces mécanismes pourrait être déterminant dans la genèse de nouvelles stratégies visant la prévention ou le traitement des infections de prothèse vasculaire. L'inoculation est le *primum movens* des infections de prothèse vasculaire (158). Au cours de ces expériences, la taille de l'inoculum utilisée *in vitro* ou *in vivo* dépassait largement la

charge bactérienne susceptible d'être présente (159) au cours d'une contamination banale de sites opératoires. Ces inocula élevés (160) sont plus susceptibles d'être rencontrés durant les chirurgies de novo ou de reprise pour des infections vasculaires déjà cliniquement avérées (infections prothétiques, aortites infectieuses, fistules prothéto-digestives, etc.). Les implications cliniques des résultats de nos expériences pourront donc en cas de validation ultime porter à la fois sur la prévention primaire et sur la prévention secondaire des infections de prothèses vasculaires.

Les bactéries atteignant la surface des implants tendent à s'y adhérer et pour certaines souches à y initier la formation d'un biofilm (41, 159). Tuer les bactéries avant qu'elles aient le temps d'adhérer peut être une étape clé dans la prévention des infections de prothèse vasculaire. Les prothèses fonctionnalisées au poly-CTR-HP β CD et chargées d'antibiotiques ont ainsi permis de réduire l'adhésion des 3 bactéries Gram négatif testées au cours de ces expériences. L'efficacité de ces prothèses était aussi confirmée pour inhiber significativement, sur une période de sept jours, la croissance *in vitro* des bactéries Gram négatif à l'exception de celle au delà des 72 heures du *Pseudomonas aeruginosa*. Ces résultats furent de plus confirmés dans le modèle murin de contamination bactérienne intense. Les prothèses fonctionnalisées avec le poly-CTR-HP β CD et chargées de CFX seule ou en association à la RFP ont significativement réduit la prolifération des 3 bactéries Gram négatif incluant celle du *Pseudomonas aeruginosa* dans ce modèle.

De façon assez similaire, PLM-CD chargée de RFP était efficace *in vitro* contre l'adhésion et la croissance des bactéries Gram positif comme *Staphylococcus aureus* et le SARM sensible à la RFP. Cette efficacité fut grandement confirmée *in vivo* dans le modèle murin de contamination bactérienne où la prolifération de ces bactéries fut significativement inhibée. Contre le SARM résistant à la RFP et contre *Staphylococcus epidermidis* il n'y avait pas d'effet objectivé sur l'adhésion bactérienne que PLM-CD ait été chargée de RFP ou de VCY. La croissance de ces deux bactéries fut en revanche inhibée sur une période de 7 jours par PLM-CD chargée respectivement de VCY ou de RFP. Ces derniers résultats ont été confirmés *in vivo*. *Staphylococcus epidermidis* et le SARM résistant à la RFP étaient même sous le seuil de détection 7 jours après l'inoculation chez les souris implantées de PLM-CD chargée respectivement de RFP ou de VCY. Ceci illustre la possibilité d'adapter le traitement antibiotique en fonction de la sensibilité aux antibiotiques du ou des germes en présence.

Les souches de *Staphylococcus epidermidis* sont particulières dans la mesure où elles sont associées à la plupart des cas d'infections de prothèse vasculaire d'origine nosocomiale et peuvent donc devenir résistantes à plusieurs classes d'antibiotiques (146). Leur capacité

unique à sécréter le slime, complexe homopolymère de N-acetylglucosamine, leur permet de former des agglomérats multicellulaires de bactéries indolentes ou métaboliquement quiescentes protégées par une grande quantité de matrice extracellulaire constituant le biofilm (147). Le biofilm soustrait en définitive ces bactéries à l'action des antibiotiques systémiques et du système immunitaire de l'hôte. Les résultats de nos expériences méritent à ce compte une attention particulière. Les prothèses fonctionnalisées à base du poly-CTR-HP β CD et chargées de RFP ont démontré (*in vitro* sur 7 jours) une efficacité soutenue et prolongée contre la croissance de *Staphylococcus epidermidis*, en dépit de leur effet nul démontré *in vitro* sur l'adhésion de cette souche bactérienne. De plus, *Staphylococcus epidermidis* était dans le modèle murin de forte contamination bactérienne à la limite du seuil de détection sur les échantillons de PLM-CD chargée de RFP. Tout ceci suggère que *Staphylococcus epidermidis* ne pouvait proliférer pour constituer le biofilm et coloniser la surface de la prothèse PLM-CD chargée de RFP quoiqu'il ait pu initialement adhéré sur ces échantillons. Ces résultats sont assez identiques à ceux obtenus contre le SARM résistant à la RFP avec les prothèses PLM-CD chargées de VCY suivant probablement des mécanismes explicatifs différents. L'adhésion de cette souche bactérienne n'était pas inhibée *in vitro* dans nos conditions expérimentales (15 minutes de contact et 24 heures d'incubation), voire un certain degré de prolifération bactérienne a été observé. Sa croissance à plus longue échéance fut sévèrement compromise sur les échantillons de PLM-CD chargée de VCY jusqu'à leur quatrième jour de désorption dans le plasma humain. De plus, dans le modèle murin de forte contamination bactérienne le SARM résistant à la RFP était au septième jour post inoculation à la limite du seuil de détection chez les animaux implantés de prothèses PLM-CD chargées de VCY. L'action bactéricide de la VCY connue pour être intense contre les bactéries Gram positif mais à début retardé explique probablement les résultats à première vue contrastés de ces 3 expériences.

Les limitations potentielles de ces expériences incluent tout d'abord celles inhérentes à tout modèle *in vitro* ou tout modèle *in vivo* d'évaluation de nouveaux biomatériaux destinés à une application clinique humaine. La transposition des résultats obtenus *in vitro* ou chez l'animal n'est pas toujours réalisable ou valide chez l'humain. Les résultats favorables que nous avons obtenus devront être investigués plus amplement en clinique. De manière plus spécifique, le sang circulant doit certainement interférer dans les interactions hôte prothèse. Un modèle de contamination bactérienne impliquant une prothèse en position fonctionnelle avec un flux sanguin circulant serait peut-être plus judicieux pour tenir compte de l'ensemble des interactions et se rapprocher encore davantage de la situation clinique chez l'homme.

Toutefois, en accord avec les réglementations de l'Union Européenne et Nord-américaines l'heure est à l'optimisation des animaux utilisés lors des expérimentations de laboratoire. Un modèle animal complexe (canin, porcin, etc) doit désormais être implémenté seulement quand la démonstration scientifique ne peut être apportée *in vitro* ou sur des modèles animaux plus simples comme le modèle murin. Les forces de ces travaux résident également dans le fait que les modèles animaux et *in vitro* utilisés sont largement connus, bien acceptés pour les différentes évaluations réalisées et qu'une diversité de souches pathogènes impliquées dans des infections vasculaires cliniques chez l'humain ont été testées.

4.5 Conclusion:

Au cours de ces travaux nous avons déterminé les conditions optimales pour la captation et la libération en fonction du temps de trois molécules antibiotiques utilisées seules ou en association pour rendre bioactives des prothèses vasculaires fonctionnalisées avec un poly-CTR-HP β CD. Nos résultats ont objectivé une activité antimicrobienne effective compatible avec un mécanisme de libération prolongée de médicaments à partir de ces prothèses. Un modèle *in vitro* de libération de médicaments en flux continu (USP4) a permis de mettre en évidence la cinétique de libération des médicaments évalués. L'innocuité, la biocompatibilité et la sécurité d'utilisation des prothèses ainsi fonctionnalisées ont été aussi démontrées dans un modèle animal. Considérés dans leur ensemble, les résultats de nos travaux sur l'efficacité potentielle de PLM-CD chargée d'antibiotiques appropriés pour la prévention primaire ou secondaire des infections de prothèse vasculaire restent concluants. Une réduction significative de l'adhésion, de la croissance ou de la prolifération bactérienne était démontrée *in vivo* ou *in vitro* contre sept des espèces bactériennes les plus couramment impliquées dans ce genre d'infections. La faisabilité démontrée de charger les prothèses fonctionnalisées d'une association de molécules antibiotiques laisse entrevoir de plus la possibilité d'adapter le traitement antibiotique délivré *in situ* à l'écologie des infections de prothèse vasculaire. Des études cliniques de sûreté et d'efficacité devront être néanmoins réalisées chez l'humain afin de valider définitivement ces excellents résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*.

CHAPITRE II: Les prothèses fonctionnalisées par un polymère d'acide poly(acrylique) pour l'immobilisation de principes actifs

4.6 Généralités sur la fonctionnalisation par immobilisation de principes actifs

4.6.1 Limitations théoriques du concept de libération prolongée de principes actifs

Le concept de la fonctionnalisation des prothèses vasculaires par un polymère d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine souffre de limitations théoriques potentielles quand il faut s'attaquer à la thrombogénicité immédiate ou tardive de ces prothèses. L'efficacité limitée dans le temps et l'inadéquation de certains principes actifs d'intérêt à former des complexes d'inclusion avec les cyclodextrines constituent à ce compte les principaux écueils. L'hémocompatibilité des matériaux polymères peut être significativement améliorée par des modifications de surface. Dans cette optique trois approches différentes ont été décrites (161) : 1) passivation de la surface de manière à obtenir le minimum d'interactions avec les protéines et les éléments figurés du sang. 2) immobilisation de molécules bioactives en vue d'interagir avec les protéines et les éléments figurés du sang. 3) promotion de l'endothélisation spontanée (161). Cette dernière est sans doute la plus prometteuse car l'endothélium est la surface physiologique la plus hémocompatible qui soit. Au cours de ces travaux nous avons cherché à combiner les deux dernières approches. Le but était de développer des prothèses vasculaires en PET pouvant servir de point d'ancrage aux cellules progénitrices endothéliales ou de substrat à la fixation ou à la libération locale d'agents thérapeutiques.

Nous avons développé un système d'immobilisation de principes actifs sur des prothèses vasculaires en polyester en vue de réduire leur thrombogénicité. Notre stratégie a consisté à soumettre la prothèse à un traitement par plasma froid suivi d'un greffage de l'acide acrylique par copolymérisation greffante. Les fonctions carboxyliques ainsi ajoutées ont ensuite permis la fixation directe ou via un agent espaceur (« spacer ») d'une molécule bioactive d'intérêt comme la simvastatine, l'héparine ou la molécule EP228243 qui est un agent inhibiteur du facteur Xa couplé d'un antagoniste de la glycoprotéine IIb/IIIa. L'étude extensive des paramètres réactionnels et l'évaluation biologique des échantillons traités nous ont permis de déterminer les conditions optimales de traitement par plasma froid, de la polymérisation greffante par l'acide acrylique et de la fixation des différents principes actifs.

4.6.2 Le principe de l'immobilisation de principes actifs

Dans le but de fabriquer des matériaux biomimétiques dont l'efficacité pourrait être maintenue au cours du temps, une immobilisation stable des composés conférant l'activité paraît essentielle. Cette immobilisation peut être réalisée par fixation chimique directe ou indirecte de biomolécules à la surface du polymère. Par la nature des biomolécules fixées elle peut viser une activité thérapeutique directe ou servir de substratum pour l'adhésion et le développement des cellules lui conférant ainsi des propriétés proches de la matrice extracellulaire (162, 163). Le développement ultime de la fonctionnalisation des biomatériaux synthétiques apparaît à ce compte comme une étape préalable déterminante même pour l'essor futur des techniques d'ingénierie tissulaire.

4.6.3 Systèmes d'immobilisation de principes actif sur un biomatériau

4.6.3.1 Adsorption physique

Diverses stratégies ont été utilisées pour immobiliser des molécules thérapeutiques ou de courtes séquences peptidiques bioactives à la surface de biomatériaux synthétiques (164). L'adsorption physique est l'une de ces méthodes. Elle fait appel à des interactions intermoléculaires faibles et non spécifiques comme des liaisons hydrogène, les forces de Van der Waal et les liaisons ioniques faibles. Ainsi pour obtenir des matériaux biomimétiques, les surfaces des biomatériaux synthétiques ont été tout simplement revêtues de peptides biomimétiques ou de tout autre composé comportant des sites fonctionnels actifs. C'est le cas de la poly-L-Lysine qui peut réagir subséquentement avec des oligopeptides. C'est le cas également des molécules hybrides comme la poly-L-Lysine-RGD (RGD = Arg-Gly-Asp) qui peuvent aussi s'adsorber physiquement à la surface des biomatériaux. Plusieurs autres protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire comme la fibronectine, la laminine et la vitronectine ont pu ainsi être adsorbées physiquement à la surface de matrices polymériques en vue d'encourager l'adhésion de cellules spécifiques (165). Néanmoins, cette stratégie d'adsorption physique n'offre qu'une modification transitoire de la surface du biomatériau. L'incapacité à contrôler la conformation des peptides, à diriger leur orientation à la surface du biomatériau, à contrôler leurs désorption et cinétique de diffusion ainsi que l'inaccessibilité des molécules de taille élevée comptent parmi les limitations de cette méthode (164).

4.6.3.2 Immobilisation chimique directe

L'immobilisation de molécules bioactives en ayant recours aux groupes hydroxyles déjà présents à la surface de nombreux biomatériaux peut être réalisée en utilisant le très réactif

chlorure de sulfonyle ($R-SO_2Cl$). Une étape de pré activation de ces surfaces en vue d'y générer des groupes sulfonates est réalisée en utilisant du chlorure de tresyle (166-168). Une réaction nucléophile peut être déclenchée secondairement entre les groupes sulfonates et des amines primaires, des groupements thiols ou imidazoles présents dans la structure moléculaire d'un agent bioactif (164). Quant aux surfaces de biomatériaux dotées de fonctions amines, l'immobilisation chimique directe de certains peptides bioactifs peut être réalisée par leur extrémité N terminale via des agents de couplage ou « *linkers* » dits homobifonctionnels tels : la glutaraldéhyde, le glutarate disuccinimidile ou le phénylène diisothiocyanate (164, 169). Alternativement, l'immobilisation de ces peptides peut être aussi réalisée sur de telles surfaces dotées de fonctions amines via leur extrémité carboxyle terminale en ayant recours au carbodiimide comme intermédiaire (170).

4.6.3.3 Immobilisation chimique après une phase de prétraitement

L'immobilisation directe via des procédés chimiques peut être réalisée quand il y a des groupes réactionnels présents à la surface des biomatériaux. En l'absence de tels groupes conférant une réactivité chimique à la surface des biomatériaux, la fixation covalente directe de molécules bioactives se retrouve compromise. Pour venir à bout de ce problème plusieurs stratégies de recherche ont visé la création de groupes fonctionnels à la surface des biomatériaux. Des techniques diverses de prétraitement ou d'activation de surface comme la photo activation, les radiations ionisantes, le traitement plasma froid et le traitement laser ont été ainsi utilisées. Nous ne relèverons ici que les plus pertinentes vis-à-vis de la stratégie de fonctionnalisation que nous avons développée au cours des présents travaux de thèse.

4.6.3.3.1 Par greffage Photochimique

Un procédé de greffage photochimique de molécules bioactives sur des supports solides a été rapporté par Li et al (171). Ces auteurs sont parvenus à immobiliser sur des surfaces siliconées de type polydiméthylsiloxane (PDMS) la courte séquence peptidique RGD. Une étape préliminaire de greffage photochimique de N-hydroxysuccinimide (NHS) sur les surfaces en PDMS était nécessaire. La fixation du RGD sur ces groupes NHS était ensuite réalisée via une réaction de couplage en utilisant un « photo-cross-linker » bifonctionnel (171). Cette méthode capable de générer des matériaux pour la culture cellulaire, autoclavables et stables aux irradiations UV (164), pourrait être mise à profit dans d'autres domaines ou pour fixer d'autres séquences peptidiques à d'autres biomatériaux polymères.

4.6.3.3.2 Par activation aux carbodiimides

La chimie des carbodiimides est une voie hautement efficace et largement répandue pour l'immobilisation covalente de peptides biomimétiques via des liaisons amides sur de nombreux biomatériaux à surface pourvue de fonctions carboxyles (172). Les carbodiimides présentent l'intérêt de pouvoir activer les fonctions carboxyles en formant des composés intermédiaires «O-acylisocarbamide» hautement réactifs. Ces composés intermédiaires interagissent secondairement avec les amines nucléophiles pour former des liaisons amides très stables chimiquement. La principale limitation de cette méthode est son absence de spécificité. Les peptides portent en effet souvent des acides aminés comportant comme groupes substituants des groupements carboxyles ou guanidine susceptibles de provoquer des réactions parallèles indésirables. Le N-hydroxysuccinimide (NHS) peut être utilisée comme une toute première étape en vue d'estérifier les fonctions carboxyliques de surface, suscitant la formation d'un ester intermédiaire actif moins susceptible à l'hydrolyse (164).

4.6.3.3.3 Par ligation chimio sélective

La ligation chimio sélective est une approche très récente pour la modification chimique de surfaces des biomatériaux. Elle implique un couplage covalent unique de groupements fonctionnels mutuellement réactifs. Des paires sélectionnées de groupes fonctionnels sont ainsi utilisées pour coupler des peptides biomimétiques et d'autres molécules bioactives à la surface des biomatériaux via des liaisons stables sans nécessité d'agent d'activation ou d'interférences avec d'autres groupes fonctionnels (173). Ces réactions sont hautement chimiosélectives et se comportent comme un « Velcro » moléculaire (174). Thumshirn et al ont démontré l'efficacité et la sélectivité élevées de la réaction de couplage à l'aminooxy aldéhyde pour une variété de substances protéiques et pour l'immobilisation subséquente à la surface de substrats (175).

4.6.3.3.4 Par ajout de polyéthylène glycol bi aminé

Yoon et al ont rapporté la fabrication de « *scaffolds* » macroporeux (littéralement échafaudage poreux) utilisant l'acide poly(lactique)-co-glycolique (PLGA). Un mélange de PLGA et de PEG di aminé a permis de générer des groupements amides de surface en vue de l'immobilisation de l'héparine. L'héparine a servi par la suite de linker pour la fixation du facteur de croissance des fibroblastes (bFGF) qui était libéré de manière prolongée sur une vingtaine de jours. Le bFGF libéré avait gardé sa bioactivité comme jugé par son incidence sur la prolifération *in vitro* des cellules endothéliales et sur la néo vascularisation *in vivo* (176). Des résultats identiques ont été rapportés par ce même groupe d'auteurs avec des

microsphères soumis à des protocoles expérimentaux identiques de fabrication et d'évaluation *in vivo* (177). A côté des résultats positifs obtenus sur la libération du bFDF, il convient de noter l'étape préliminaire d'immobilisation de l'héparine, molécule connue pour ces propriétés anticoagulantes.

4.6.3.3.5 Par traitement plasma froid

La fixation covalente directe de molécules bioactives sur les surfaces de polymères chimiquement inertes est difficile. Une étape de pré activation suivie parfois d'une multitude de procédés réactionnels chimiques est le plus souvent nécessaire. La modification de surface par un traitement plasma froid des implants cardiaques, vasculaires et orthopédiques ainsi que de plusieurs autres dispositifs médicaux ont été un sujet de recherche pendant maintenant plusieurs années (43). Les résultats obtenus sont fonction du type de décharge électrique, des conditions de la décharge, des facteurs géométriques de la chambre de réaction et des propriétés du substrat (178, 179). Le traitement plasma froid est utilisé pour introduire des groupements fonctionnels (amine, peroxide, carboxyle, etc.) sur la surface de nombreux biomatériaux. La présence de ces groupements peut résulter en la modification de certaines propriétés physico-chimiques et biologiques des biomatériaux ainsi traités (43). Les groupements fonctionnels obtenus avec un traitement par plasma froid peuvent constituer des sites de prédilection pour le greffage subséquent d'un polymère ou d'un copolymère à la surface d'un biomatériau donné. Le greffage du copolymère amène ainsi à la surface du biomatériau davantage de groupements fonctionnels pouvant servir à lier de manière covalente une molécule bioactive d'intérêt (180). De Bartolo et al, en utilisant un traitement plasma froid polymérisant, ont ainsi modifié des membranes en polyéther imide sulfone (181). Ils ont greffé à la surface de ces membranes de l'acide acrylique suivi de l'immobilisation covalente du peptide RGD via un agent espaceur « spacer » hydrophile flexible, le PEG linéaire di aminé. *In vitro*, les membranes ainsi modifiées avaient des propriétés proches de l'environnement extracellulaire intra hépatique. Il s'y établissait des interactions spécifiques avec les hépatocytes résultant en un système bio hybride tout à fait fonctionnel (production d'albumine, sécrétion de protéine et biotransformation de médicaments) (181). Keranov et al ont rapporté la biofonctionnalisation par traitement plasma froid de surfaces siliconées en (poly)dimethylsiloxane (PDMS) (182). Suite au traitement plasma froid, un procédé de greffage d'acide acrylique était réalisé à la surface du PDMS avant de coupler les fonctions carboxyles ainsi rajoutées avec un agent espaceur de type PEG di aminé. Le collagène type I était finalement immobilisé à la surface du PDMS via cet agent

espaceur (182). Toutes ces données suggèrent la possibilité de fonctionnaliser par des étapes différentes et progressives la surface de polymères même très hydrophobes et chimiquement inertes. L'intérêt serait de pouvoir contrôler, orienter ou réguler certaines interactions cellulaires avec la surface des biomatériaux pour améliorer la culture cellulaire, l'ingénierie tissulaire, l'intégration, la tolérance et les propriétés biologiques de ces biomatériaux (182).

4.6.4 Fonctionnalisation des prothèses vasculaires par traitement plasma froid

4.6.4.1 Généralités sur les plasmas froids

Le traitement plasma est une technique très attractive utilisée pour le nettoyage, la préparation et la modification de biomatériaux (183). Le terme plasma fait référence ici au quatrième état de la matière et correspond à un mélange constitué de molécules neutres (majoritaires), d'ions (négatifs et positifs), d'électrons, d'espèces radicalaires (chimiquement très actives), de photons et autres espèces excitées (184). Dans les conditions normales de température et de pression, un milieu gazeux ne permet pas la conduction de l'électricité car ne contenant aucune particule chargée libre (électrons ou ions positifs). Ces dernières peuvent apparaître quand on soumet le gaz à des températures suffisamment élevées, à un champ électrique de forte intensité, quand on le bombarde de particules ou quand il est soumis à un champ électromagnétique très intense. Lorsque l'ionisation est assez importante pour que le nombre d'électrons par unité de volume soit comparable à celui des molécules neutres, le gaz devient alors un milieu très conducteur qu'on appelle plasma.

Les plasmas existent naturellement et sont extrêmement répandus dans l'univers puisqu'ils représentent plus de 90% de la matière connue. On en trouve notamment dans les étoiles, les nébuleuses gazeuses, les quasars, les pulsars, les aurores boréales, les éclairs, l'ionosphère et le vent solaire. Les plasmas peuvent être produits industriellement ou au laboratoire par l'excitation sous l'effet d'une décharge électrique d'un gaz placé en général sous un vide primaire. La décharge électrique peut être induite par une source de courant continu (~1kV) ou par une source de courant alternatif à basse fréquence (ondes radio ou micro-ondes). Les plasmas radiofréquence (kHz au MHz) et micro-onde (2.45 GHz) sont les plus couramment utilisés (183). La Figure 66 représente schématiquement un appareil de traitement plasma froid avec un générateur de type radiofréquence (185).

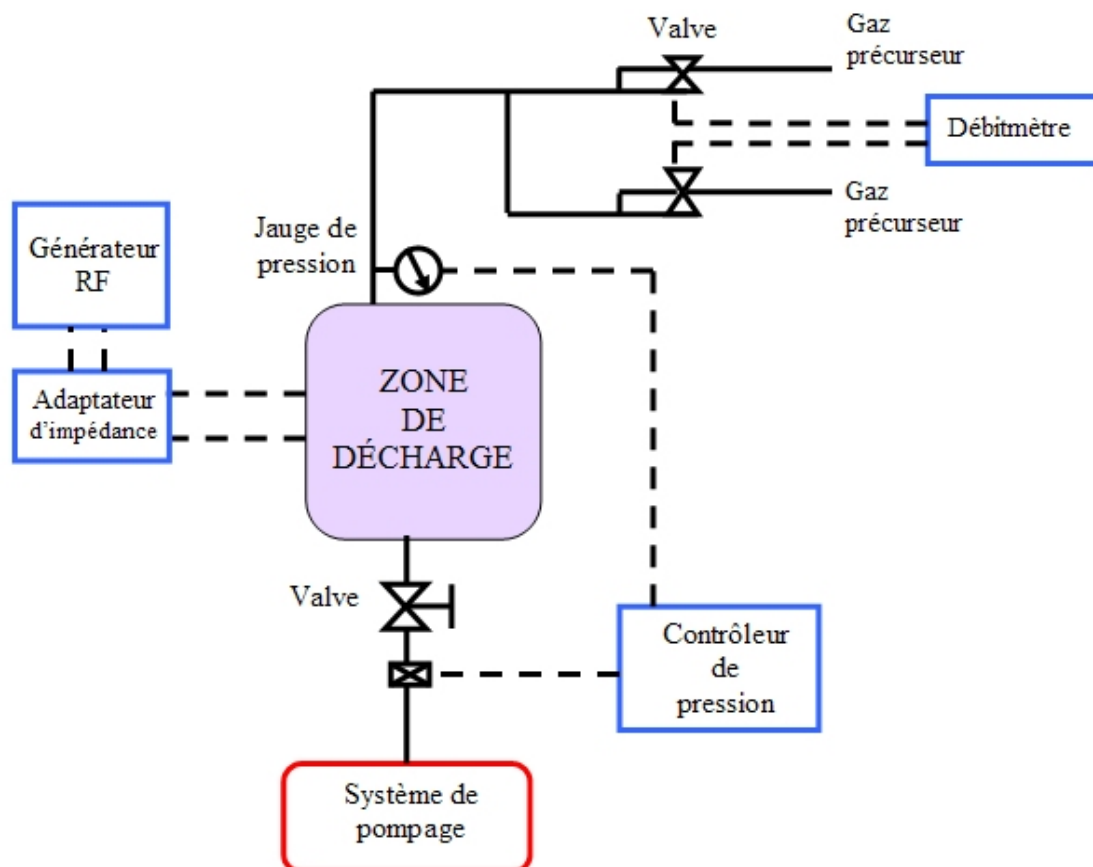


Figure 66 : Schématisation d'un appareil de traitement plasma froid (185).

Les plasmas froids gazeux, également appelés plasmas non équilibrés (ou glow discharge plasmas) sont générés à basse pression (10^{-1} – 10^5 Pa). Ces plasmas sont dits "froids" car ce sont des milieux hors équilibre thermodynamique où l'énergie est captée essentiellement par les électrons mais où la température "macroscopique" du gaz va de l'ambiante à quelques degrés centigrade. D'un autre côté, les électrons possèdent des niveaux d'énergie correspondant à de très hautes températures (1 à 10 eV) (183). Le processus réactionnel est décrit dans la Figure 67. Les électrons émis par l'électrode entrent en collision avec les molécules de gaz et les activent. Il se produit alors une ionisation ou une dissociation avec création de radicaux. Ces espèces excitées vont diffuser dans l'enceinte du réacteur et en particulier arriver à la surface du substrat (Figure 67).

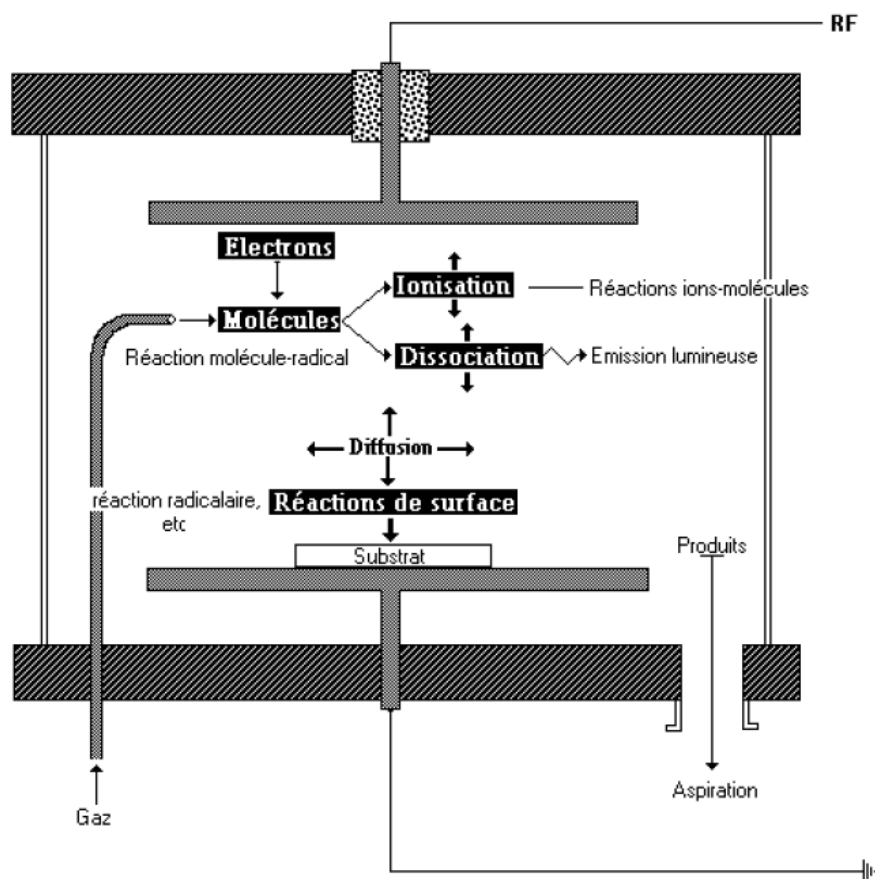


Figure 67 : Schématisation du processus réactionnel survenu dans une enceinte plasma froid
(source Biophy: <http://www.biophyresearch.com/>)

Le traitement plasma affecte les propriétés physiques et chimiques de surface du substrat (sur les 10 premiers angströms) sans en changer (au delà de 100 angströms) les propriétés intrinsèques (43, 178, 183, 184, 186). Plusieurs types de réactions de surface peuvent survenir (implantation, transfert d'énergie, création de liaisons ou destruction de liaison) avec modification des propriétés comme : la mouillabilité, l'énergie de surface, l'adhésivité des métaux, l'index de réfraction, la dureté, l'inertie chimique et la biocompatibilité du substrat (170, 178). Un échantillon placé à la cathode d'une enceinte plasma contenant de l'argon sera par exemple soumis à un flux continu d'ions Ar énergétiques dont l'énergie dépend principalement de la pression et du voltage appliqué. Les ions Ar énergétiques en heurtant l'échantillon peuvent provoquer trois types d'effets importants à sa surface: 1°) émission d'atomes, de molécules, d'agrégats et d'électrons depuis la couche de surface la plus superficielle. Ce premier effet sous-tend l'application des traitements plasma au nettoyage de surface des biomatériaux. 2°) destruction ou cassure des lésions internes au niveau des molécules adsorbées à la surface. 3°) mélange d'atomes et implantation d'ions sur toute la zone de pénétration des ions Ar (183, 187). Ces deux derniers effets peuvent conduire à des

changements structuraux de surface, manifestes à l'échelle atomique ou à diverses échelles macroscopiques. Ils peuvent par exemple résulter en la formation de nouvelles couches restant chimiquement liées à la surface du substrat (183). Ces effets sont dus à des réactions chimiques entre les ions et les espèces neutres du gaz d'une part et la surface du substrat de l'autre. Si des gaz beaucoup plus réactifs comme l'oxygène, l'azote ou des hydrocarbures sont introduits dans l'enceinte plasma des effets additionnels pourront aussi prendre place. Une large variété de modifications chimiques de surface deviennent ainsi possibles comme l'introduction de groupes fonctionnels de surface (carboxyle, amine, etc) (183) en vue d'améliorer la biocompatibilité et permettre l'immobilisation covalente de composés bioactifs (186). De façon similaire, des molécules organiques diverses peuvent être introduites dans l'enceinte plasma en vue d'obtenir un revêtement de surface au carbone ou un revêtement par une couche très mince d'un polymère déterminé. Ce film très mince déposé à la surface d'un substrat peut aller de quelques dizaines d'angströms à plusieurs milliers d'angströms (184). En pratique, beaucoup de composés organiques comme le méthane sont incapables de polymérisation par des méthodes conventionnelles mais seulement sous l'effet d'un système plasma. D'un point de vue strictement chimique, nous pouvons diviser les plasmas en 2 catégories : les plasmas ne formant pas des polymères et les plasmas formant les polymères. Dans la première catégorie, les gaz soumis dans l'enceinte plasma à la décharge électrique ne sont pas de nature polymérisable. Le N_2 , le NH_3 , le H_2 et les gaz nobles en font partie. Dans la deuxième catégorie, les monomères introduits dans l'enceinte plasma sont polymérisables en ce sens qu'ils peuvent en tout ou en partie rentrer dans la constitution de macromolécules (184).

4.6.4.2 Etudes antérieures sur le plasma froid appliqué aux prothèses vasculaires

Plusieurs études ont fait état de modifications de surface du PET, du PTFE et du ePTFE (43). Dekker et al ont traité au plasma froid des prothèses en PTFE avec de l'oxygène et de l'azote introduits comme gaz réactionnel dans l'enceinte plasma (170). *In vitro*, les cellules endothéliales adhéraient et croissaient à la surface du PTFE quand les prothèses ainsi traitées étaient immergées dans un milieu de culture contenant 20% de sérum humain (170). Pratt et al ont retrouvé *in vitro* des résultats similaires avec le PET traité par plasma froid et/ou revêtu de fibronectine (187). Des expériences *in vivo* visant à démontrer l'efficacité du traitement plasma ont été conduites chez le chien (188). Bien qu'ayant eu recours à des anneaux ou des tubes en verre Pyrex implantés au niveau de la veine cave inférieure, matériau loin des

structures textiles ou métalliques des prothèses et des endoprothèses vasculaires actuelles, ces expériences méritent d'être relatées ici. Baier et al ont démontré que les tubes en verre traités plasma froid avec de l'argon comme gaz restaient à 480 jours perméables au niveau de la veine cave inférieure du chien alors que les tubes en verre non traités étaient remplis de caillots (188). De façon similaire, Joseph et Sharma ont rapporté les effets positifs obtenus sur l'adhésion plaquettaire avec des prothèses en polyuréthane traitées par plasma froid et revêtues d'une couche d'albumine (189). Il a été postulé que *in vivo* les effets du traitement plasma froid passeraient par le caractère plus hydrophile conféré au substrat et par le changement des propriétés physico-chimiques qui favoriseraient l'adhésion de certaines protéines plasmatiques. Ces protéines plasmatiques influenceraient secondairement et de manière favorable l'endothélisation de surface des prothèses vasculaires ainsi modifiées (187). Sipehia et al ont ainsi comparé *in vitro* des supports en PTFE, en ePTFE, en PET, en poly (2-hydroxyethylmethacrylate) et en silastic, traités ou non traités plasma froid avec NH₂ et oxygène comme gaz. L'immobilisation de protéines comme l'albumine et la fibronectine connues pour favoriser l'adhésion des cellules endothéliales a été le critère principal de comparaison. Elle s'est révélée améliorée sur tous les supports traités plasma froid probablement via des interactions ioniques entre des protéines d'origine humaine et les groupes fonctionnels introduits sur les substrats par le traitement plasma froid (190).

Les groupements fonctionnels néoformés suite à un traitement par plasma froid peuvent, néanmoins, ne pas être stables dans le temps (191), compromettant ainsi une application clinique à grande échelle de la méthode. De même, une adsorption sélective des protéines plasmatiques humaines n'est pas garantie à ce stade du développement de la technique. Certaines protéines en circulation dans le sang humain pourraient en effet en cas d'adsorption produire des effets totalement inverses ou opposés à ceux escomptés. Alternativement, les groupements fonctionnels (amine, peroxide, carboxyle, etc.) introduits par le traitement plasma froid à la surface des prothèses vasculaires ont été proposés pour l'immobilisation immédiate de molécules bioactives. Chandy et al ont décrit l'immobilisation de nombreuses molécules bioactives comme la prostaglandine E1 (PGE1), l'héparine et la phosphatidylcholine sur des prothèses vasculaires en PET et en PTFE traitées plasma froid et revêtues de collagène ou de laminine (192).

Les groupements fonctionnels néoformés peuvent aussi constituer des sites de prédilection pour le greffage subséquent d'un polymère ou d'un copolymère à la surface du biomatériau vasculaire. Le greffage du copolymère amène ainsi à la surface du biomatériau des groupements fonctionnels qui sont beaucoup plus stables et qui peuvent lier de manière

covalente la molécule bioactive d'intérêt (180). La présence de ces groupements peut aussi résulter en la modification de certaines propriétés physico-chimiques et biologiques des biomatériaux modifiés. Les résultats obtenus *in vitro* étaient satisfaisants par rapport à l'adsorption du fibrinogène et par rapport au dépôt des plaquettes sur la surface des biomatériaux évalués (192). Les polymères acryliques sont en odontologie rentrés depuis longtemps dans la fabrication de résines implantées chez l'humain. A ce titre, ils font l'objet de nombreuses investigations expérimentales récentes pour l'amélioration de leurs propriétés biologiques (193, 194). La biocompatibilité de ces polymères est également bien connue, étant utilisés comme excipient dans un certain nombre de formulations pharmacologiques. Ils sont actuellement expérimentés dans des nanocapsules (195) ou des microparticules pour l'administration de nombreuses molécules thérapeutiques comme la Vitamine B12 (196), des agents anticancéreux comme la Doxorubicine (197) ou des médicaments antifongiques comme l'éconazole ou le miconazole (198). Dans le domaine des biomatériaux, les polymères acryliques ont été testés dans un certain nombre de concepts de fonctionnalisation (199). San Roman et coll. ont utilisé des polymères acryliques pour libérer de l'acide salicylique à partir de prothèses vasculaires en PET (200). Ils avaient recouvert ces prothèses avec des polymères acryliques hydrophiles avant de les tester *in vitro* et dans un modèle *ex vivo* de circulation extracorporelle chez le chien. D'autres auteurs ont investigué la fixation de l'héparine et de l'insuline (201), du collagène (144) ou de courtes séquences peptidiques comme le RGD (172) sur des biomatériaux en mettant à profit des fonctions carboxyles obtenues par greffage d'acide polyacrylique ou un greffage de polyacrylamide. L'intérêt d'un traitement plasma froid préalable pour optimiser le procédé de greffage d'acide polyacrylique est aussi favorablement évalué dans la littérature (202). Baquey et al ont démontré de plus l'intérêt sur le ePTFE d'utiliser un « *linker* » (= agent espaceur) comme le polyéthylène glycol (PEG) pour la fixation de certaines molécules comme le RGD (172). A noter que le nombre de fonctions carboxyles sur le ePTFE était optimisé dans leurs expériences via un greffage d'acide polyacrylique (172).

4.6.5 Objectifs des présents travaux

Dans cette deuxième partie de nos travaux, nous avons cherché à développer un système de fonctionnalisation en immobilisant de manière covalente et pérenne des molécules bioactives à la surface du PET. Nous avons eu recours à un traitement plasma froid suivi d'une copolymérisation greffante à l'acide acrylique avant de fixer avec ou sans l'aide d'agents espaceur les molécules bioactives d'intérêt sur les fonctions carboxyles rajoutées au PET.

4.6.6 Le concept développé

Le concept développé au cours de ces travaux est explicité par la Figure 68. La surface de prothèses vasculaires en PET a été traitée au plasma froid avant de subir une copolymérisation greffante avec l'acide acrylique. Le copolymère ainsi obtenu disposait à sa surface de nombreux groupements carboxyles (COOH). Ces groupements sont destinés à fixer directement ou via un bras espaceur une ou plusieurs molécules thérapeutiques ou bioactives.

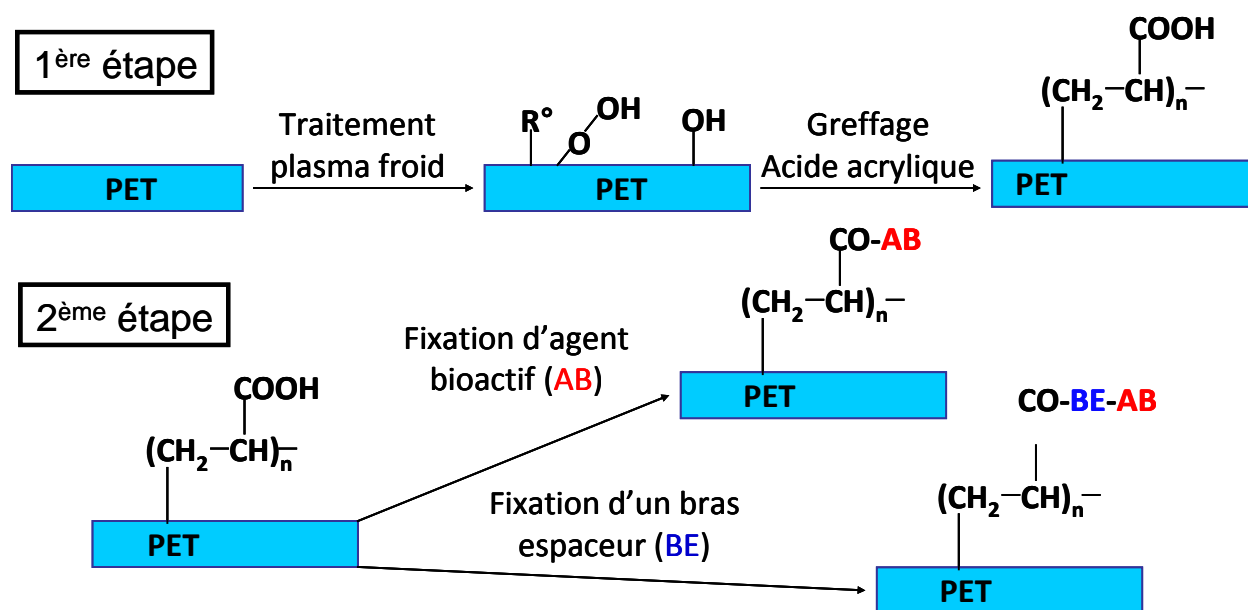


Figure 68: Schéma réactionnel de la fonctionnalisation du PET (R^\bullet = radicaux libres ; AA=acide acrylique ; AB = Agent bioactif ; BE = bras espaceur)

4.6.7 Choix des molécules bioactives

Nous avons choisi des agents bioactifs pour fonctionnaliser le PET greffé au vu de leurs propriétés connues pour réduire l'hyperplasie intinale ou pour empêcher la survenue de phénomènes trombotiques. Ces agents incluent : la simvastatine, l'héparine et la molécule EP224283 ; le pari étant que ces molécules gardent leurs sites actifs accessibles et fonctionnels pour conserver leur efficacité biologique tout en étant immobilisé à la surface du PET.

1) **La simvastatine** (Figure 69) est une statine, c'est-à-dire un inhibiteur puissant de l'enzyme hydrométhylglutaryl CoA réductase (HMG-CoA réductase) impliquée dans la biosynthèse du cholestérol. Le site actif des statines est le groupement lactone (Figure 69). Les statines, en dehors de leurs effets hypolipémiants, possèdent d'autres propriétés que l'on rassemble fréquemment sous le terme d'effets pléiotropes (203, 204). Ces effets anti-inflammatoires, immunomodulateurs, et antioxydants seraient indépendants de la baisse du cholestérol

circulant et s'exerceraient directement sur les cellules cibles en inhibant les voies métaboliques du mévalonate (205-207). De plus, une protection vis à vis de la dysfonction endothéliale, marqueur précoce de l'athérosclérose, a aussi été mise en évidence avec les statines. Elle passerait par l'augmentation de la production de NO (*Nitric Oxyde*) par les cellules endothéliales (208, 209).

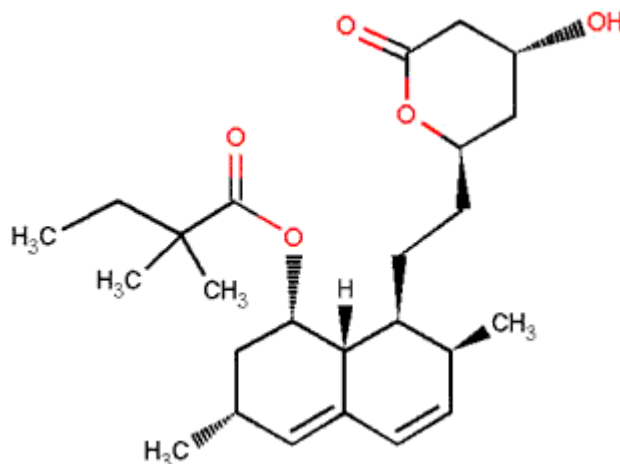


Figure 69 : Formule chimique semi développée de la simvastatine

Le NO, puissant vasodilatateur, est connu pour stimuler la prolifération des cellules endothéliales (210), réduire la prolifération musculaire lisse (211), inhiber l'adhésion plaquettaire (212), et diminuer le chimiotactisme des leucocytes médiateurs de l'inflammation (213). Si les statines administrées par voie systémique n'ont pas été démontrées efficaces dans la prévention des resténoses en pratique clinique (214), il existe des arguments suggérant que l'atteinte par cette voie d'une concentration sub-optimale au niveau de la paroi vasculaire serait en cause (215). L'un de nos objectifs au cours de ces travaux était de modifier le PET vasculaire en vue de réduire l'hyperplasie myointimale. En ayant la statine présente localement un implant vasculaire pourrait interagir in situ avec les cellules endothéliales pour encourager la production de NO et réduire directement la prolifération des cellules musculaires lisses. Nous avons envisagé l'immobilisation directe de la simvastatine au vu de sa structure moléculaire par une réaction d'estérification des fonctions COOH rajoutées à la surface du PET via une étape intermédiaire de préactivation des COOH en ayant recours au carbodihymide EDAC.

2) **L'héparine** non fractionnée ou Acide L-iduronique-2-O-sulfate (alpha1-4) D-glucosamine-N sulfate, 6-O-sulfate (alpha1-4) est une glycosaminoglycane constituée d'unités disaccharidiques trisulfatées (Figure 70). Sa masse moléculaire moyenne est de 14 000 (comprise entre 3 500 et 35 000 daltons). La découverte de l'héparine est due à Mac Lean en

1916; Howell en 1918, en a précisé la nature chimique mais ce n'est qu'en 1936 qu'elle a été utilisée pour la première fois chez l'homme comme anticoagulant.

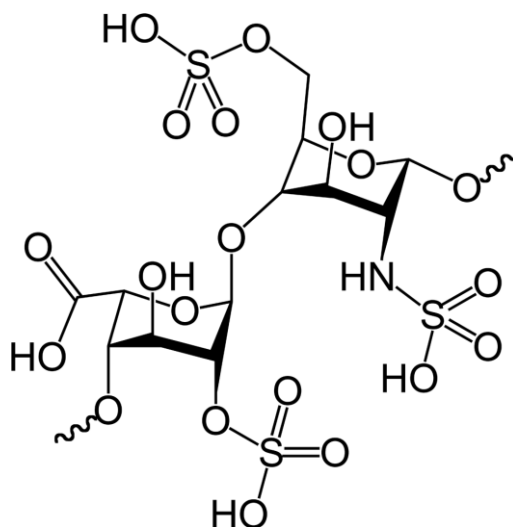


Figure 70 : Formule semi développée de l'héparine

Il s'agit d'une molécule aux propriétés anticoagulantes maintenant éprouvées et très utilisée dans le traitement curatif et préventif des maladies thromboemboliques. L'héparine exerce son activité anticoagulante en présence de l'antithrombine III (ATIII) dont elle potentialise l'effet inhibiteur sur les sérines protéases de la coagulation. L'une des technologies de fixation covalente de l'héparine (*end point immobilisation*) a abouti à une application clinique avec des résultats satisfaisants mais ne concerne que l'ePTFE (104, 105). L'héparine immobilisée à la surface du PET et capable d'interagir *in situ* avec l'antithrombine III et le facteur Xa permettrait de réduire la thrombogénicité d'un nombre encore plus important d'implants (prothèses ou endoprothèses) vasculaires dont la structure principale est en PET. Le greffage de l'acide poly(acrylique) à la surface du PET pourrait fournir le nombre de fonctions COOH nécessaires pour une immobilisation directe de l'héparine via une étape intermédiaire de préactivation des COOH avec le carbodihymide EDAC. Le site actif de l'héparine étant les pentasaccharides, les prothèses ainsi modifiées devraient être évaluées favorablement par rapport à des tests de coagulation sanguine.

3) **La molécule EP224283** combine dans une seule molécule de l'idraparinux et du tirofiban (Figure 71). L'idraparinux est un agent inhibiteur du facteur X activé (Xa) avec des propriétés anticoagulantes importantes et amplement investiguées (216-219). Le tirofiban est un agent antagoniste de la glycoprotéine anti- α Ib β 3 et à ce titre est un puissant antiagrégant plaquettaire (220). EP224283 a démontré *in vitro* et *in vivo* à la fois des propriétés

antiagrégant plaquettaires et anticoagulantes du fait du transfert des propriétés pharmacocinétiques de l'idraparinux à celles de l'antagoniste anti- α IIb β 3 (221). Pour répondre à la fois aux problèmes de thrombogénicité intrinsèque du PET et d'hyperplasie myointimale après implantation des prothèses ou des endoprothèses vasculaires, la molécule EP224283 apparaît comme une molécule idéale.

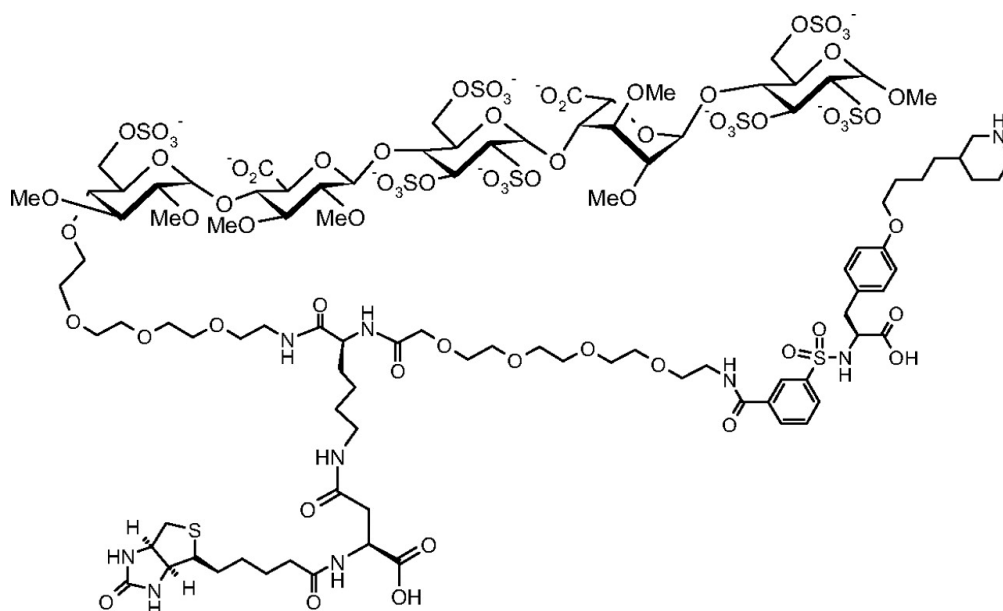


Figure 71 : Formule chimique semi développée de la molécule EP224283 (221)

La structure moléculaire de EP224283 comporte de plus un groupe biotine qui n'est pas impliqué dans son activité pharmacologique mais qui est prévu pour une complexation avec l'avidine administrée comme antidote en cas de surdosage (221). La liaison avidine biotine est en effet la liaison non covalente la plus forte qui soit. Le résidu biotine présent dans la structure moléculaire de EP224283 pourrait être mis à profit pour son immobilisation à la surface de biomatériau notamment à la surface des prothèses vasculaires en PET en vue de diminuer leur thrombogénicité.

4.6.8 Composition du bras espaceur

Dans le but de fixer la molécule EP224283 qui est un ligand biotinylé nous avons choisi de réaliser un couplage du PET greffé (PET-AA) avec le PEG bi aminé 500. Le PEG bi-aminé [O, O'-bis-(2-aminopropyl)-polyethylene glycol 500 ou bNH₂PEG (Figure 72) a l'avantage de pouvoir constituer un bras espaceur flexible permettant aux ligands de disposer d'une accessibilité maximale. Les ligands peuvent ainsi interagir avec leur cible et maintenir une conformation semblable à celle qu'ils présenteraient en solution (222).

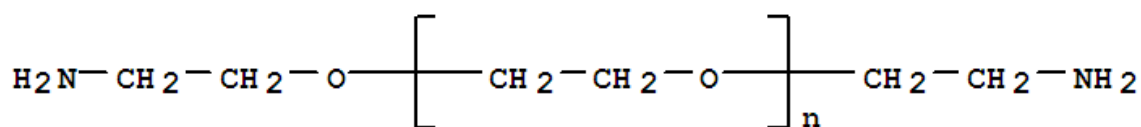


Figure 72 : Formule chimique semi développée du polyéthylène glycol di aminé

La chaîne linéaire du PEG peut être de longueur variable en fonction des propriétés du ligand. Les moyens possibles de fixation directe du ligand au PEG sont de deux ordres. La fixation du ligand peut se faire de manière covalente à un copolymère qui comprendrait le PEG. Alternativement le ligand peut être couplé à des nanoparticules préformées disposant de groupements pouvant réagir avec une extrémité NH_2 terminale du PEG. Cependant certaines propriétés physico-chimiques des ligands peuvent rendre ces méthodes complètement inappropriées. Le couplage avec les nanoparticules préformées peut en effet occasionner la fuite ou la dénaturation du ligand encapsulé. Une troisième voie consisterait pour des molécules bioactives éligibles à réaliser le couplage de manière non covalente en mettant à profit les interactions avidine-biotine.

La biotine ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$) ou vitamine H ou vitamine B8 ou coenzyme R est composée d'un noyau de 2-imidazolidinone fusionné avec un noyau thiolane auquel est rattaché un groupe acide pentanoïque (Figure 73).

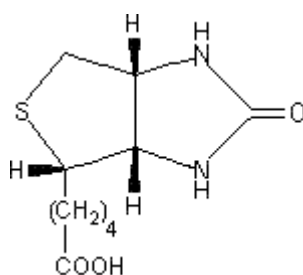


Figure 73 : Formule chimique semi développée de la biotine

L'avidine est une protéine homotetramérique isolée du blanc d'œuf qui peut fixer avec une forte affinité jusqu'à 4 molécules de biotine (Figure 74). L'interaction avidine – biotine en affichant des constantes d'association de l'ordre de 10^{15}M^{-1} représente la plus forte interaction biologique non covalente connue.



Figure 74 : la structure 3D de l'avidine

La formation d'une liaison avidine biotine est très rapide et une fois formée elle n'est affectée ni par les changements extrêmes de température, de pH, ni par les solvants organiques ou d'autres agents dénaturants. Il est ainsi possible de former des complexes supramoléculaires mettant à profit l'avidité des 4 sites de liaison de l'avidine pour des molécules de Biotine. Plusieurs avancées technologiques récentes en génétique et en biologie moléculaires sont basées sur ce principe. Ainsi l'avidine a été couplée de manière covalente à des liposomes en vue d'attacher plusieurs protéines biotinylées d'intérêt (223).

De plus il a été rapporté la synthèse du copolymère poly(lactique-polyethylene glycol) avec des extrémités PEG biotinylées. Ce copolymère biodégradable et résistant à une adsorption protéique non spécifique peut par son groupe biotine et les interactions avidine biotine permettre l'ingénierie chimique de surface de plusieurs biomatériaux (224).

4.7 Matériels et méthodes

4.7.1 Matériels

4.7.1.1 Le polyéthylène téréphtalate

Le polyéthylène téréphtalate ou PET (Figure 75) est un thermoplastique de la famille des polyesters, obtenu industriellement par la polycondensation de l'acide téréphtalique et de l'éthylène glycol. Deux mises en forme du PET ont été utilisées au cours des travaux suivants. Le PET non-tissé utilisé au cours des expériences préliminaires a été fourni par Pridesa

(Tratamiento De Aguas Y Residuos, Central Del Medio, 173-08907- L'Hospitalet, Espagne) sous forme de membranes de 10x10 cm et de 30 g /m² de masse surfacique. Le PET tissé utilisé lors des expériences subséquentes a été fourni par Pérouse Médical (Ivry-Le-Temple, France) sous forme de rubans ou de prothèses vasculaires tubulaires de 20 mm de diamètre (Polythèse®) non imprégnées de collagène. Ce PET tissé était constitué de deux fils ayant chacun 100 dtex de masse linéique et une densité de 133 g/m².

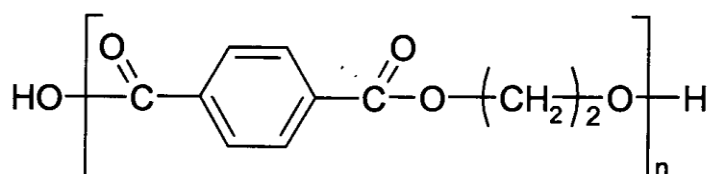


Figure 75 : Formule chimique semi développée du PET

Pour la réalisation des expériences, nous avons préparé des échantillons en découpant à l'emporte-pièce des disques dans les spécimens de PET tissé et non tissé mis à notre disposition. Des disques de 6 mm, 11 mm et 15 mm de diamètre ont été ainsi préparés selon les besoins des différentes expérimentations. Tous les disques ont été ensuite lavés par extraction au Soxhlet, pendant 3 heures à l'éthanol puis 3 heures à l'eau avant toute expérimentation.

4.7.1.2 Les produits chimiques

L'acide acrylique (C₃H₄O₂, 99,5% anhydre) ou acide prop-2-énoïque (Figure 76) était acheté chez ACROS ORGANICS (France).

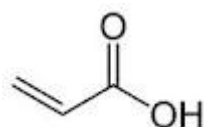


Figure 76 : formule chimique semi développée de l'acide acrylique

Le PEG bi-aminé [O, O'-bis-(2-aminopropyl)-polyethylene glycol 500 ou (bNH₂PEG) provenait de Fluka Chemie (Buchs, Suisse). La biotine (C₁₀H₁₆N₂O₃S), l'avidine, le N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide (EDAC), le 2-morpholinoethane-sulfonic acide (MES) et tous les autres composés et réactifs chimiques utilisés provenaient de Sigma Aldrich (France).

4.7.1.3 Les principes actifs

La simvastatine était fournie par Artemis (lot SV04+6/06/2K). L'héparine sodique Choay non fractionnée à 5000 UI/mL utilisée au cours de ces travaux était fournie par Sanofy-Aventis (Paris, France). La molécule EP224283 était gracieusement fournie par Endotis Pharma (Romainville, France).

4.7.2 Méthodes

4.7.2.1 Activation du polyester par traitement plasma froid

Dans le but d'apporter à la surface du PET des radicaux libres (R^\bullet), des groupements hydroxyles, peroxydes et hydroperoxydes, les disques de PET ont été exposés au traitement plasma froid. L'appareil de traitement plasma froid utilisé est un 12400 MC Combi (EuroplasmaTM), d'une puissance de 300 watts, et fonctionnant à une fréquence de 13,56 MHz (Radiofréquence). La pression était fixée à 130 mTorr. Cet appareil est doté d'une enceinte confinée sous vide primaire.



Figure 77: Enceintes plasma froid

Le plasma froid était généré en transférant une décharge électrique à un gaz plasmagène introduit dans l'enceinte et composé d'argon (Ar) à 85% et d'oxygène (O_2) à 15%. La surface du PET a été ainsi activée. L' O_2 disponible dans l'enceinte formait avec un plus ou moins grand nombre de radicaux libres à la surface du PET, des groupements hydroxyles (OH), peroxydes (C-O-O-C) et hydroperoxydes (C-O-O-H). Ces groupements obtenus à la surface du PET serviront pour la copolymérisation greffante de l'acide acrylique (AA).

4.7.2.2 Greffage de l'acide acrylique

Dans le but de greffer l'acide poly(acrylique) (PAA) à la surface du PET, une solution de monomères d'acide acrylique (AA) était préparée à des concentrations définies : 0,5 M – 1,5M – 2,5M et 5M. Le procédé réactionnel est résumé dans la Figure 78. La solution d'AA

était mise dans un ballon plongé dans un bain d'huile thermostaté et portée à des températures déterminées (40°C – 60°C – et 80°C). Des échantillons de PET tissés ou non tissés traités par plasma froid pendant 120 secondes ont été exposés à un air pur et sec pendant 35 secondes puis exposés à l'air ambiant pendant 45 minutes après leur activation. Ces échantillons étaient ensuite plongés, pendant un temps déterminé, dans le bain d'AA en agitation, une fois la température consigne atteinte. La durée de la procédure réactionnelle était prédéterminée allant jusqu'à 6 heures. Un copolymère formé de PET et d'acide polyacrylique (PAA) était ainsi obtenu (PET-AA). Ce copolymère disposait à sa surface des fonctions COOH portées par les greffons de PAA (Figure 78).

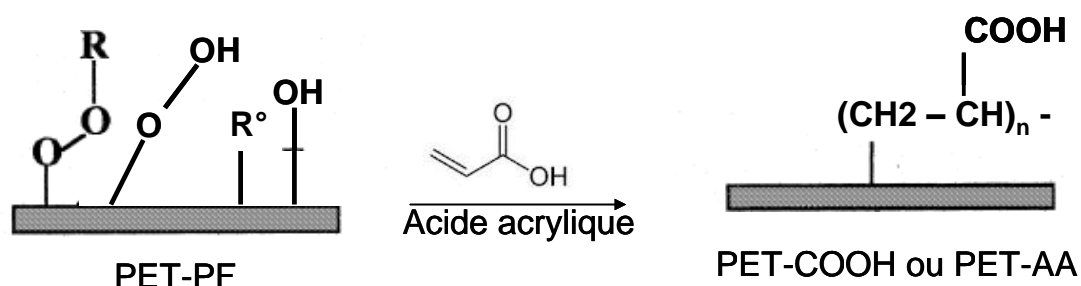


Figure 78 : Schéma réactionnel du greffage de l'acide poly(acrylique) sur le PET traité par plasma froid (PET-PF) pour produire le PET greffé (PET-AA).

Les échantillons de PET-AA obtenus ont été 3 fois de suite rincés à l'eau distillée placée dans un bac à ultrasons puis lavés par extraction au Soxhlet pendant 24 heures afin d'enlever les résidus d'homopolymères adsorbés à la surface. Différents paramètres pouvant influencer le taux de greffage de fonctions COOH sur le PET ont été évalués. L'optimisation du nombre des fonctions COOH présentes à la surface du PET, visée par cette expérimentation, offrait une augmentation du nombre de sites disponibles pour la fixation covalente de molécules bioactives porteuses de fonctions amines (NH_2) ou pour toute réaction d'estérification.

4.7.2.3 Immobilisation de molécules bioactives après greffage d'acide polyacrylique

4.7.2.3.1 Fixation sans agent espaceur de la simvastatine et de l'héparine

La fixation de la simvastatine comme celle de l'héparine sur le PET-AA a été effectuée par l'utilisation d'un intermédiaire, l'EDAC ou *N*-(3-Diméthylaminopropyl)-*N*'-éthylcarbodiimide (Sigma-Aldrich). L'EDAC (Figure 79) était utilisé ici pour activer les fonctions COOH créés suite au greffage de l'acide polyacrylique sur le PET.

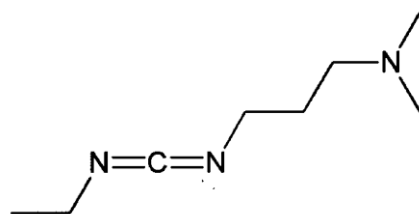


Figure 79 : formule chimique semi-développée de l'EDAC

L'EDAC était préparé à une concentration d'un g/L dans une solution tampon de citrate de sodium (22 g/L, pH 4,7). Au cours de cette étape des échantillons de PET-AA et de PET (témoin négatif) ont été imprégnés durant 2 heures dans la solution d'EDAC (1 g/L) à 4°C. Après trois rinçages successifs, (un rinçage au tampon citrate de sodium et deux à l'eau milliQ), les échantillons ont été imprégnés dans une solution de molécule bioactive à 1 g/L (solubilisée dans l'acétonitrile 60%) à 4°C pendant 24 heures. Au terme d'une réaction de substitution, l'EDAC lié aux groupements COOH, laissait sa place à la molécule bioactive créant ainsi une fonction ester (Figure 80).

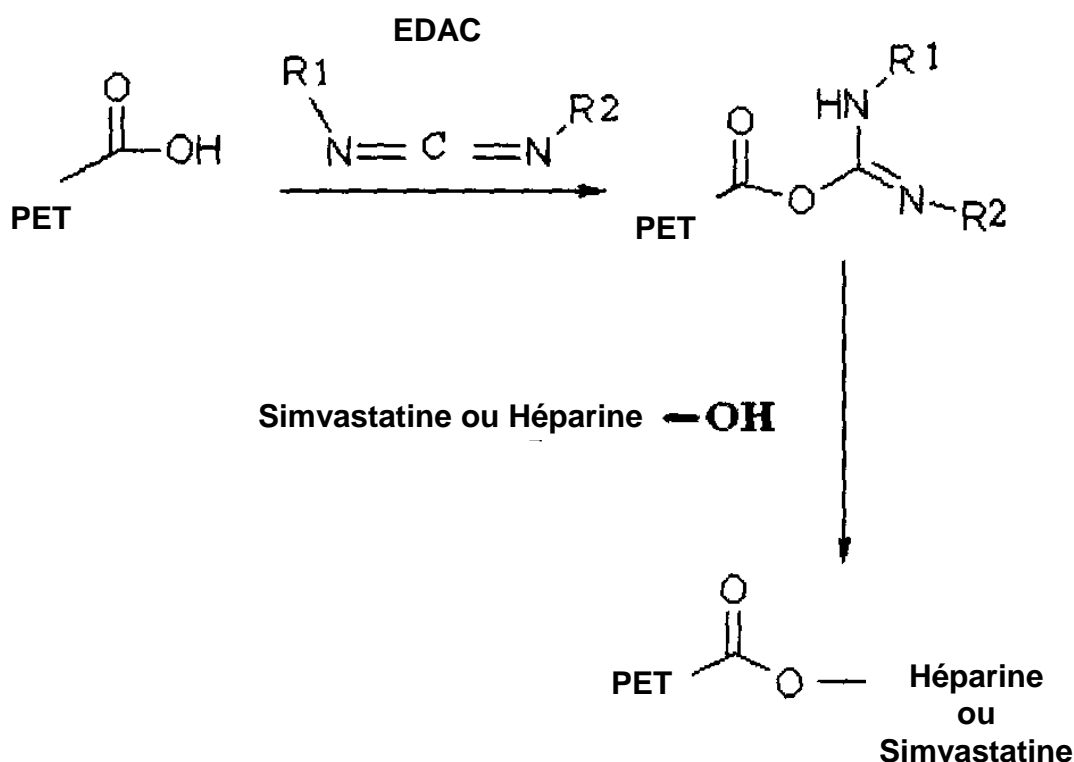


Figure 80 : Schéma réactionnel de la fixation de l'héparine ou de la simvastatine après activation des fonctions COOH par l'EDAC

Les échantillons ainsi obtenus ont été rincés une fois à l'acétonitrile 60% et deux fois à l'eau milliQ avant d'être séchés dans une étuve à 30°C. Ces échantillons ont été ensuite caractérisés physico-chimiquement et biologiquement.

4.7.2.3.2 Fixation à l'aide d'un agent espaceur de la molécule EP224283

La fixation de la molécule EP224283 sur le PET-AA était réalisée en plusieurs étapes incluant la fixation préalable d'un agent espaceur (le bNH₂-PEG), la biotinylation de cet agent espaceur, le couplage de ce complexe biotinylé à l'avidine, suivis de l'immobilisation proprement dite de la molécule pré-biotinylée EP224283.

4.7.2.3.2.1 Fixation de l'agent espaceur bNH₂-PEG

L'agent espaceur utilisé en vue de l'immobilisation subséquente de molécules bioactives est le PEG di-aminé (bNH₂-PEG). Dans le but de fixer à la surface du PET cet agent espaceur, une étape d'activation des fonctions COOH présentes à la surface du PET-AA était préalablement réalisée. Les échantillons ont été imprégnés pendant 1 heure à 4°C dans une solution tampon MES (0,2M; pH=5) additionnée de 140mg d'EDAC par volume de 10mL. L'EDAC était utilisé comme dans l'expérience précédente pour activer les fonctions COOH à la surface du PET-AA et conduire au cours d'une réaction d'estérification à la fixation du bNH₂-PEG. Les échantillons ainsi activés ont été ensuite imprégnés pendant 24 heures à 4°C dans une solution tampon à base de MES (pH=5 ; 20 g/L d'eau milliQ) contenant le bNH₂-PEG à 0,1M.

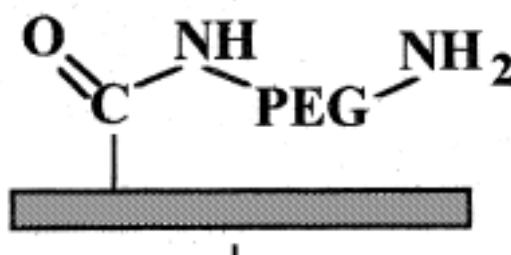


Figure 81 : PET avec à sa surface l'agent espaceur bNH₂-PEG immobilisé

Des échantillons de PET vierge (sans greffage d'acide poly(acrylique) traités dans les mêmes conditions servaient de témoins (PET). Le rapport de bain à chacune de ces étapes était de 1mL de solution/ échantillon. Au terme de l'expérimentation, les échantillons étaient rincés 2 fois successivement pendant 5 minutes dans de l'eau distillée placée dans un bac à ultrasons avant d'être conditionnés pour les expériences suivantes. Il s'établissait ainsi à la surface des échantillons des fonctions amines utilisables (Figure 81) pour la fixation covalente des molécules avec une extrémité oxyde ou carboxyle.

4.7.2.3.2 Biotinylation de l'agent espaceur bNH₂-PEG et complexation avec l'avidine

Une étape d'activation préalable était réalisée à 4°C pendant 1 heure, en diluant la biotine dans la solution de MES à pH=5 additionnée d'EDAC à raison de 100 mg pour chaque 10 mL de solution tampon MES. Ce qui avait pour objectif d'activer le groupement carboxyle de la biotine. Les échantillons porteurs de l'espaceur bNH₂-PEG étaient mis en imprégnation dans cette nouvelle solution pendant 24 heures à 4°C de manière à ce qu'il s'établisse une liaison covalente entre les molécules de biotine en solution et les groupements NH₂ du substrat (Figure 82).

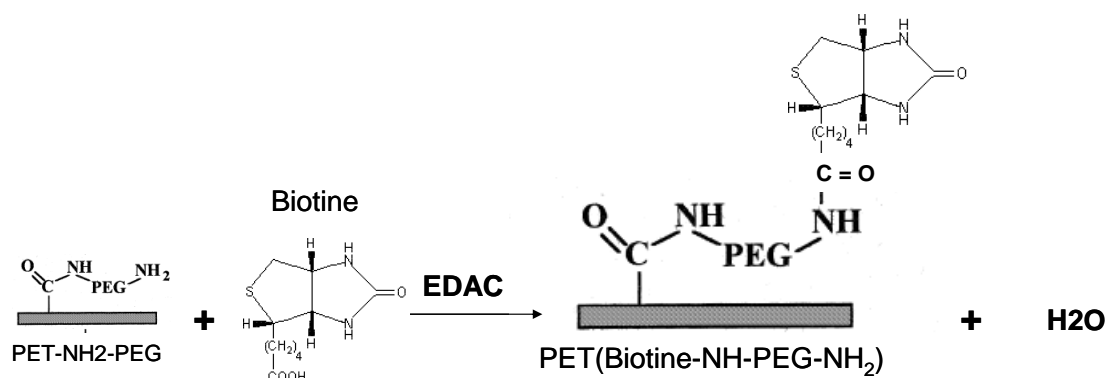


Figure 82 : Schéma réactionnel de la biotinylation de l'agent espaceur bNH₂-PEG

Les échantillons obtenus (PET-AA-PEG-Biotine) étaient conditionnés et séchés à 37°C. Ils étaient ensuite soumis à une réaction de complexation avec l'avidine. L'avidine en solution dans du sérum salé isotonique (NaCl 0,9%) a été mise en contact direct avec les échantillons (500µL par échantillon de 6mm de diamètre) pendant 1 heure à 37°C sous agitation (80rpm). Ce qui résulte en une complexation directe (Figure 83) des molécules d'avidine en solution avec les molécules de biotine immobilisées sur le substrat lors de la première étape.

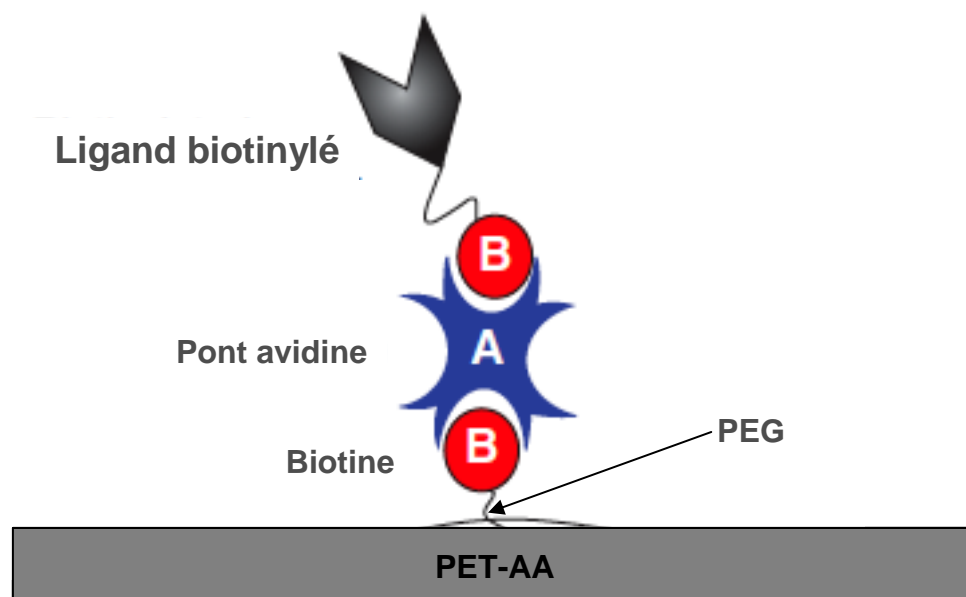


Figure 83 : Complexation biotine – avidine – ligand biotinylé : (B = biotine ; A = avidine)

4.7.2.3.2.3 Immobilisation proprement dite de la EP224383

L'affinité avidine-biotine est la plus forte des liaisons non covalentes connues entre un ligand et une protéine (225). Au cours de la troisième et dernière étape (Figure 83), la molécule EP224283 en solution dans du NaCl 0,9% était rajoutée sur les échantillons obtenus précédemment et rincés au sérum physiologique. La molécule EP224283 comme mentionné antérieurement (4.6.7) est un ligand biotinylé c'est-à-dire dotée d'un résidu biotine capable de fixer aussi spécifiquement et préférentiellement l'avidine rajoutée sur les substrats prothétiques lors de la deuxième étape. L'avidine étant un homo tétramère dispose de 4 sites d'immobilisation de la biotine (La molécule EP224283, une fois rajoutée au mélange, vient via son résidu biotine s'ancrer automatiquement à l'avidine déjà immobilisée sur les substrats prothétiques. Ce faisant, la molécule EP224283 était aussi immobilisée sur les supports PET (Figure 83).

4.7.2.4 Caractérisation physico-chimique de la fonctionnalisation du PET

Plusieurs techniques ont été utilisées pour apprécier l'efficacité et ainsi optimiser les paramètres de modifications du PET par greffage de l'acide polyacrylique.

4.7.2.4.1 Dosage colorimétrique des fonctions carboxyles présentes à la surface

Le bleu de toluidine oxydé (TBO), contenant un cation coloré et fluorescent (TB⁺), peut se substituer au proton des groupements carboxyles (COOH) présents sur la surface du PET et du PET-AA en milieu basique (Figure 84) par interactions ioniques. Il est ainsi possible

d'effectuer un dosage colorimétrique au TBO des fonctions COOH par spectrophotométrie UV-visible à 634 nm.

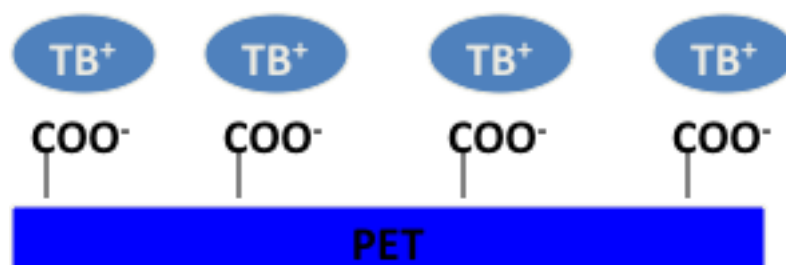


Figure 84 : Schématisation de la réaction d'oxydation des fonctions acides par le toluidine

Au cours de cette étude, une solution de TBO (5×10^{-4} M, pH 10) était préparée puis mise en présence du PET greffé avec l'AA (PET-AA) ou du PET non greffé (PET) pendant 5 heures, à 30°C et à l'abri de la lumière. Les groupes carboxyles (COOH) présents sur les échantillons sont alors complexés avec le TBO dans un ratio de 1/1. Les échantillons sont ensuite rincés dans une solution de NaOH à pH 10 afin d'enlever l'excès de TBO non complexé à la surface du PET. Pour finir, les échantillons sont plongés dans 10 mL d'une solution d'acide acétique à 50% en volume, pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. Le TBO complexé sur le PET est alors désorbé dans cette solution d'acide acétique dont l'absorbance est mesurée par la suite à 634 nm par spectrophotométrie (Nicolet Evolution 300 spectrophotometer, THERMO ELECTRON CORPORATION). La loi de Beer-Lambert permet d'exprimer la relation de proportionnalité entre l'absorbance ainsi mesurée et le nombre de fonctions COOH greffées sur le PET.

4.7.2.4.2 *Dosage colorimétrique des fonctions amines présentes à la surface*

L'acide orange ou hélianthine ou encore méthylorange (Figure 85) est un indicateur coloré permettant de doser indirectement les groupements amines (NH_2) présents ou rajoutés à la surface du PET. Le méthylorange est rouge orangé à $\text{pH} < 3,2$ et jaune à $\text{pH} > 4,4$. Les amines peuvent être considérées comme des bases faibles au sens de Brönsted.

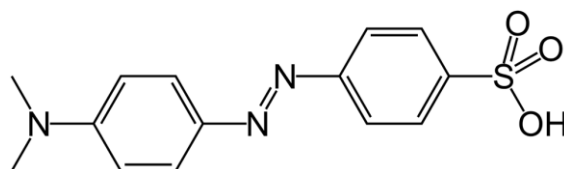


Figure 85 : formule chimique semi développée du méthylorange

Le principe de la méthode est d'effectuer un dosage colorimétrique à l'acide orange des fonctions NH_2 par spectrophotométrie UV visible à 485 nm. Brièvement, une solution de méthylorange ($2,55 \times 10^{-2}$ M, pH 3) était préparée puis mise en présence des échantillons à tester (10mL/échantillon) pendant une nuit, à 25°C, à l'abri de la lumière et sous agitation (60 rpm). Les groupes amines (NH_2) présents sur les échantillons sont alors complexés avec le méthylorange dans un ratio supposé de 1/1. Les échantillons étaient ensuite rincés dans l'eau acidifiée (à pH 3 avec de l'HCL à 0,5M) en vue de laver l'excès de méthylorange non complexé à la surface du PET. Pour finir, les échantillons étaient plongés, chacun pendant 1 nuit, à 25°C, à l'abri de la lumière et sous agitation (60 rpm), dans 10 mL d'eau distillée à pH ajusté à 12 avec de la soude 0,5M. Le méthylorange complexé sur le PET était ainsi désorbé dans la solution de soude dont l'absorbance fut mesurée à 485 nm par spectrophotométrie UV (Nicolet Evolution 300 spectrophotometer, THERMO ELECTRON CORPORATION). Une loi de Beer-Lambert déterminée préalablement permettait d'exprimer la relation de proportionnalité entre l'absorbance ainsi mesurée et le nombre de fonctions NH_2 présentes sur les différents groupes d'échantillons de PET testés.

4.7.2.4.3 Mesure de l'angle de goutte

La mouillabilité du PET a été évaluée par la mesure de l'angle de goutte (Digidrop goniomètre, GBX scientific instrument, France) comme rapportée antérieurement (139). Brièvement, une goutte de 5 μL d'eau est déposée à l'aide d'une seringue à la surface du PET. L'image de la goutte est capturée par une caméra vidéo et l'angle de contact mesuré. Toutes les mesures ont été effectuées à 37°C. Les données étaient exprimées comme la moyenne des angles de goutte mesurés en triplicata pour chaque condition expérimentale.

4.7.2.4.4 Analyse Thermo-gravimétrique (ATG)

L'analyse thermogravimétrique (ATG) ou TGA pour les auteurs anglo-saxons (*ThermoGravimetric Analysis*) est une technique d'analyse qui consiste en la mesure de la variation de masse d'un échantillon au cours d'une montée en température. Au cours de cette étude, les mesures ont été réalisées sur une machine de marque TA Instruments, modèle TGA-Q50, sous flux constant d'azote (100 mL/min), de la température ambiante jusqu'à 800°C à une vitesse de 10°C/minute.

4.7.2.4.5 Microscopie électronique à balayage (MEB)

La surface des disques de PET et de PET modifié était observée à l'aide d'un microscope électronique à balayage (JEOL JSM 5300) à une tension d'accélération de 25 kV et une intensité de 100mA en vue d'évaluer l'homogénéité du greffage.

4.7.2.4.6 La Microscopie à Force Atomique (AFM)

La topologie du PET et du PET modifié était analysée en utilisant un microscope à force atomique (Veeco Instruments, Nanoscope Dimension 3000). La technique dite en mode de percussion ou «taping mode» a été utilisée pour explorer la surface des fibres des échantillons traités comparés aux échantillons non traités.

4.7.2.4.7 Spectroscopie infrarouge

L'analyse des échantillons de PET et de PET modifié a été réalisée entre 4 000 et 625 cm⁻¹ en utilisant l'accessoire ATR («réflexion totale atténuée») du spectromètre infrarouge PERKIN ELMER. L'analyse des spectres obtenus en spectroscopie infrarouge permet de déceler la présence à la surface de ces échantillons d'une liaison chimique ou d'un groupement fonctionnel ayant provoqué un déplacement ou une modification de spectre. Nous pouvions ainsi caractériser certaines modifications apportées sur les supports prothétiques.

4.7.2.4.8 Evaluation de la résistance mécanique des échantillons

Une machine d'essai universel [INSTRON 4466 (Adamel Lhomargy)] a été utilisée pour mesurer la résistance mécanique des échantillons selon un axe longitudinal ou transversal. En vue d'évaluer la résistance aux tractions longitudinale et circonférentielle, des spécimens de PET et de PET modifié, découpés en éprouvettes de 5mm de large et de 22 mm de long (forme d'haltère), ont été accrochés au dynamomètre. Les essais étaient réalisés à température ambiante à une vitesse de 20 mm/ min. La courbe contrainte déformation était enregistrée jusqu'à ce que le point de rendement et/ou de rupture ait été atteint. La force par unité de longueur de l'échantillon : $F_{u,l}$ était calculée comme suit :

$$F_{u,l} \text{ (N.cm}^{-1}\text{)} = F_r / (2*L)$$

Le pourcentage de dilatation à la rupture était donné par :

$$\text{Dilatation (\%)} = 100 * A_r / (Jl \dots \dots \dots)$$

4.7.2.5 Evaluation biologique de la fonctionnalisation du PET

4.7.2.5.1 Les cellules et les cultures cellulaires

Les HPMEC-ST1.6R ont été courtoisement fournies par le Dr. Krump-Konvalinkova et le Pr. Kirkpatrick (*Institute of Pathology, University of Mainz, Germany*). Elles constituent une lignée cellulaire immortalisée à partir de cellules endothéliales micro-vasculaires pulmonaires humaines (HPMEC = *Human pulmonary microvascular endothelial cells*) et ayant conservé quelques caractéristiques importantes du phénotype des cellules endothéliales (226). Elles ont été cultivées dans un milieu spécifique aux cellules endothéliales, l'endothelial cells growth medium MV (PromoCell[®], France), additionné de 15% de serum de veau foetal (FBS = *foetal bovine serum*, Gibco, France) et du *SupplementMix/endothelial cells growth medium MV* (PromoCell[®], France).

Les HUVEC (PromoCell[®], C-12200) ou *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* sont des cellules issues de la culture primaire de cellules provenant de l'endothélium des veines ombilicales humaines. Elles étaient cultivées dans un milieu spécifique aux cellules endothéliales, «*endothelial cells growth medium MV* (PromoCell[®], France)», en présence du «*SupplementMix/endothelial cells growth medium MV* (PromoCell[®], France)».

Les HPASMC (PromoCell[®], C-12521) ou *Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells* sont des cultures primaires de cellules musculaires lisses dérivées de la *tunica media* et de l'*intima* d'artères pulmonaires humaines saines. Elles ont été cryopréservées après leur deuxième passage et peuvent être cultivées après dégel jusqu'au douzième doublement de population. Elles ont été cultivées dans un milieu spécifique, le *smooth muscle cell growth medium 2* (PromoCell[®], C-22062,) additionné du *SupplementMix/smooth muscle cell growth medium 2* (PromoCell[®], C-39267).

Nous avons cultivé les cellules dans des flacons de culture en polystyrène (Nunc, Polylabo, Strasbourg, France) incubés à 37°C dans une atmosphère humide composée de 95% d'air et 5% de CO₂. Pour tous les types cellulaires, nous avons supplémenté les milieux de culture avec 50 µg mL⁻¹ de gentamicine (Panpharma, France) et 25 µg mL⁻¹ de fungizone (Gibco BRL). La croissance des cellules était alors assurée jusqu'à sub-confluence avant de les détacher par trypsinisation (0,05% Trypsin/EDTA, Gibco BRL). Lors des expérimentations, toutes les cultures cellulaires *in vitro* étaient réalisées dans un incubateur CO₂ de marque 'CB 150/APT-line CO₂incubator' (Binder, Germany), à 37°C, avec 95% d'air, 5% de CO₂ et 100% d'humidité relative.

4.7.2.5.2 Test de cytotoxicité par la mesure de la vitalité cellulaire (Bleu Alamar)

La cytotoxicité du PET vierge et du PET traité selon diverses conditions expérimentales a été évaluée sur des cultures de cellules endothéliales et musculaires lisses par la méthode du BLEU ALAMAR (227, 228). Après un bref rinçage à l'éthanol 75°, les échantillons prothétiques à tester sous forme de disques de 12 mm étaient placés dans des plaques 48-puits de culture cellulaire en polystyrène (TCPS, Nunc, Polylabo, Strasbourg, France). Pour chaque groupe expérimental, 3 échantillons ont été utilisés. Des anneaux Viton[®], biocompatibles, en caoutchouc servaient à maintenir les échantillons au fond des puits et éviter la croissance cellulaire au-delà des disques de PET. Les échantillons ont étéensemencés avec 5×10^3 cellules par puits. Le substrat TCPS de puits vides d'échantillons a été aussiensemencé avec 5×10^3 cellules et utilisé comme témoin négatif. Trois ou six jours après l'ensemencement des cellules sur les échantillons, 500 µL d'un colorant fluorescent non toxique (AlamarBlue dye, Interchim, Montluçon, France) dilué à 10% dans le milieu de culture cellulaire correspondant étaient ajoutés à chaque puit. Après 3 heures d'incubation à 37°C, 150 µL de milieu étaient prélevés pour chaque condition expérimentale et transférés dans une plaque 96-puits (Nunc, Polylabo, Strasbourg, France). L'absorbance a été mesurée par fluorimétrie (Twinkle LB970 fluorometer, Berthold Technology, GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Germany) à une longueur d'onde de 650 nm. La vitalité cellulaire était calculée comme un ratio de l'absorbance des cellules sur les disques de PET testé par rapport à celle des cellules sur le témoin négatif (TCPS). Les essais ont été tripliqués et les résultats finaux exprimés comme une moyenne des pourcentages obtenus lors des 3 expérimentations individuelles.

4.7.2.5.3 Test d'hémocompatibilité par la mesure de l'index d'hémolyse

Dans le but de déterminer le caractère hémolytique induit potentiellement par la modification de surface du PET, un test d'hémolyse a été réalisé. Du sang total était prélevé sur des donneurs adultes sains volontaires ne recevant aucune médication. Le consentement éclairé de tous les donneurs a été obtenu. Huit (8) disques de 15 mm de diamètre par groupe expérimental d'échantillons ont été placés dans des plaques 6-puits en polystyrène (TCPS, IWAKI, Dublin, Irlande). Chaque puits a été additionné de 4 mL de PBS. Un puits vide d'échantillon contenant 4 mL de PBS et un autre contenant 4 mL de carbonate sodique (Na_2CO_3) servaient respectivement de témoins négatif et positif. La plaque était mise à incuber à 37°C sous agitation pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. Soixante (60) µL de sang prélevé d'un donneur sain volontaire ont été additionnés à chacun des puits avant d'être remis à incuber sous agitation pendant une (1) heure additionnelle ou pendant 24 heures. Le

contenu de chaque puits a été ensuite transvasé dans un tube en verre pour centrifugation à 3250rpm, à température ambiante, pendant 10 minutes. La densité optique du surnageant a été mesurée à 540 nm (Nicolet Evolution 300 Thermo Electron Corporation). L'indice d'hémolyse était calculé comme un quotient de différences de densité optique multiplié par 100 : différence entre un échantillon et le témoin négatif et différence entre le témoin positif et le témoin négatif ($\% \text{ hémolyse} = (\text{DO échantillon testé} - \text{DO témoin négatif}) * 100 / (\text{DO témoin positif} - \text{DO témoin négatif})$). Un indice d'hémolyse <5% était nécessaire pour répondre aux standards appliqués aux dispositifs médicaux implantables selon la norme ISO (International Organisation for Standardisation) - 10993-4.

4.7.2.5.4 Les tests plaquettaires

4.7.2.5.4.1 L'adhésion plaquettaire in vitro

4.7.2.5.4.1.1 Préparation de concentrés plaquettaire

Le PRP obtenu d'un donneur sain volontaire a été épuré des protéines plasmatiques (Figure 86) en utilisant une technique de séparation par gel filtration. Brièvement, nous avons coulé une colonne de chromatographie en utilisant la Sepharose 2B (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suède). Cette colonne était ensuite équilibrée avec une solution à pH 7,4 de *bovine serum albumin* (BSA) dissoute à 4 mg/mL dans un milieu tampon suspenseur pour plaquettes (TSP).

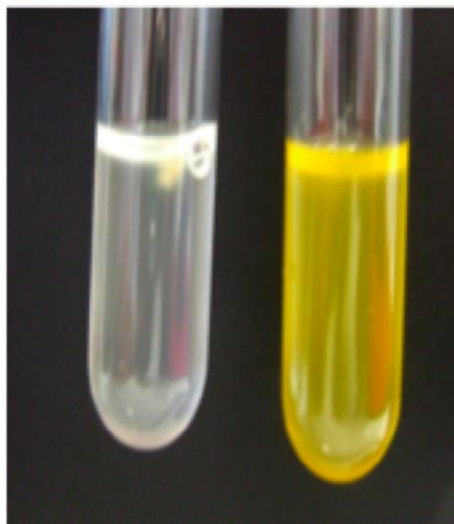


Figure 86 : Figure 17: PRP épuré (à gauche) ; PRP d'origine (à droite)

Le TSP est une solution à pH 7,4 et contenant: 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 0,4 mM de phosphate de sodium monobasique, 5,5 mM d'HEPES, 2,5 mM de CaCl₂, 0,1 UI/mL d'apyrase, et 1,0 mM de MgCl₂ (229). L'élution du PRP était réalisée sur la colonne de chromatographie et les fractions contenant les plaquettes identifiées par leur turbidité élevée.

Un comptage plaquettaire était pratiqué en utilisant le compteur de cellules hématologiques Sysmex (XS-800i). Les fractions plaquettaires les plus riches étaient réunies en une solution unique dont la concentration a été mesurée (Sysmex, XS-800i).

4.7.2.5.4.1.2 Détermination d'une échelle de densité optique de référence

Des dilutions en série d'un nombre de plaquettes connu ont été réalisées en utilisant la solution de BSA dissoute dans du TSP. Pour chaque facteur de dilution, 50 µL de solution plaquettaire étaient prélevés en triplicata et transférés dans une plaque 96-puits (Nunc, Polylabo, Strasbourg, France). Une solution de Triton-PBS à 1,5% était ajoutée (50 µL) à chaque puits en vue de lyser les plaquettes. Après une heure d'incubation à 37°C, un substrat colorimétrique pour la LDH (Roche diagnostics, Mannheim, Germany) a été ajouté (50 µL) et la plaque remise à incuber à l'abri de la lumière pendant 20 min à 37°C. La réaction était ensuite arrêtée par l'ajout de 25 µL d'HCl à 1N. La densité optique de la LDH était mesurée par spectrophotométrie UV à 490 nm avec une longueur d'onde de référence de 650 nm puis corrélée pour chaque facteur de dilution au décompte plaquettaire réalisé par Sysmex (XS-800i).

4.7.2.5.4.1.3 Détermination de nombre de plaquettes adhérees sur des supports en PET

Des disques de 15 mm de PET et de PET traité selon diverses conditions expérimentales ont été placés dans des plaques 24-puits de cultures tissulaires en polystyrène (TCPS, Nunc, Polylabo, Strasbourg, France). Des disques de verre prédécoupés de 15 mm ont été achetés dans le commerce (Ted Pella, Inc., Redding, CA, #26021) et servaient de témoin négatif. Des anneaux Viton® en caoutchouc servaient à maintenir les disques au fond de ces puits et à limiter le contact des plaquettes aux seuls échantillons, sans atteindre le TCPS. Quatre échantillons de chaque groupe étaientensemencés chacun avec 200µL d'un concentré plaquettaire à 5×10^7 plaquettes par mL de TSP. Après 30 min d'incubation à 37°C dans des conditions statiques, chaque puits était aspiré du surnageant et rincé 6 fois avec du PBS. 100 µL respectivement de TPS et de Triton-PBS à 1,5% étaient ensuite ajoutés en vue de lyser les plaquettes restées adhérees sur les supports. Après une heure d'incubation à 37°C, le substrat colorimétrique de la LDH était ajouté (100 µL dans chaque puits) et la plaque remise à incuber pendant 20 min à 37°C à l'abri de la lumière. La réaction était arrêtée par l'ajout de 50 µL d'HCl à 1N. 175 µL de cette nouvelle solution étaient prélevés pour chaque échantillon et transférés dans la plaque 96-puits. La densité optique de la LDH était mesurée comme décrit plus haut et rapportée à l'échelle de densité optique de référence pour avoir le nombre

de plaquettes ayant adhéré sur chaque type de support. Les résultats étaient exprimés comme la moyenne du nombre de plaquettes dans chaque groupe avec son écart type.

4.7.2.5.4.2 Cinétique d'agrégation plaquettaire in vitro

Dans le but de déterminer la cinétique de l'agrégation plaquettaire au contact du PET et du PET traité selon diverses conditions expérimentales, des échantillons de 11mm de diamètre ont été mis pour chaque groupe au fond de tubes Falcon de 14 mL (Eppendorf, France). Le sang total, recueilli (après les 2 premiers ml) d'un donneur sain volontaire, a été centrifugé à 1000 rpm pendant 15 minutes pour l'obtention du plasma riche en plaquettes (PRP). Le surnageant PRP était prélevé et le sang mis encore en centrifugation pendant 15 minutes additionnelles de manière à générer le plasma pauvre en plaquettes (PPP). La concentration plaquettaire du PRP était ajustée par l'ajout du PPP de façon à obtenir une solution comportant 250000 plaquettes par mL. Dans chaque tube Falcon, 1.5mL de cette solution était ajouté au contact des échantillons. Des tubes en verre étaient utilisés comme témoin négatif. L'agrégation plaquettaire induite à l'adénosine di phosphate (ADP) a été mesurée toutes les 5 minutes pendant 2 heures à l'aide d'un agrégomètre (Sysmex, XS-800i) pour chaque classe d'échantillons.

4.7.2.5.5 Les tests de coagulation sanguine au contact du PET fonctionnalisé

4.7.2.5.5.1 Cinétique de coagulation sanguine

Nous avons conditionné à 37°C pendant 1 nuit des disques de PET vierge et de PET traité selon diverses conditions expérimentales. Le sang fraîchement obtenu de donneurs sains volontaires était utilisé sans refroidissement préalable et sans l'addition d'agent antithrombotique. Sur chacun des échantillons placés dans des boîtes 48-puits (5 répliques par condition expérimentale) trente (30) µl de ce sang étaient versés. L'incubation était réalisée à 37°C. A des temps pré-définis (5', 15', 25', et 35') le processus naturel de coagulation sanguine au contact des substrats prothétiques était bloqué par l'ajout de 1 mL d'une solution tampon phosphate (PBS). Les globules rouges non encore emprisonnés au temps T au sein du caillot sanguin en formation pouvaient alors diffuser dans la solution de PBS, facilités par la mise en agitation à 200 rpm pendant 10 minutes de la boîte 48 puits. Le liquide de chaque puits était collecté dans des tubes à hémolyse puis soumis à une lyse des globules rouges en suspension par l'ajout de 4 mL de triton 1,5%. La concentration d'hémoglobine libre était mesurée par spectrophotométrie UV visible à 541 nm. La valeur ainsi déterminée était inversement proportionnelle à l'intensité de la coagulation au contact de la prothèse pour un temps donné (230).

4.7.2.5.5.2 Temps de céphaline activée

Dans le but d'évaluer l'effet de la fonctionnalisation des prothèses vasculaires sur le déclenchement du processus de coagulation, une exploration de la voie intrinsèque de la coagulation a été réalisée au contact d'échantillons prothétiques. Le sang prélevé de donneurs sains volontaires était récupéré dans des tubes contenant du citrate de sodium (0,109mol/l). Des échantillons tripliqués de PET et de PET modifié par condition expérimentale ont été mis au fond de tubes à hémolyse d'une capacitance de 4 mL. Des tubes à hémolyse ne contenant aucun échantillon servaient de témoins. Un volume de 1,25mL de sang total citraté a été additionné à chacun des tubes puis mis à incuber à 37°C, sous agitation à 80 rpm, pendant 30 minutes. Au terme de la période d'incubation, les tubes étaient centrifugés pendant 10-15 minutes à 2500g de manière à générer le plasma pauvre en plaquettes (PPP) qui était récupéré dans des tubes eppendorf. Les PPP ainsi récupérés étaient soumis à une mesure automatique du temps de céphaline activée (TCA) en utilisant l'analyseur automatique SYSMEX CA-7000. Les temps mesurés étaient rapportés au temps moyen des tubes témoins en vue d'obtenir le ratio (TCA test/ TCA témoin). Les résultats étaient exprimés comme un ratio moyen \pm écart-type.

4.7.2.6Analyse statistique

L'analyse statistique était réalisée en utilisant le logiciel StatView®6.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Les tests de rang de Wilcoxon et U de Mann-Whitney étaient utilisés pour la comparaison entre deux groupes respectivement des variables continues appariées ou non appariées. Pour les comparaisons multiples ou pour les mesures répétées, un test de Kruskal-Wallis ou une analyse de variance (ANOVA) suivie de tests post-hoc selon Bonferroni-Dunn étaient réalisés pour comparer les données comme appropriées. Le niveau de significativité statistique était défini pour une valeur de $p \leq 0.05$.

4.8 Résultats

4.8.1 Greffage de fonctions carboxyles à la surface du PET

4.8.1.1 Optimisation et caractérisation du traitement plasma froid

Dans le but de déterminer le temps optimal d'exposition du polyester dans l'enceinte plasma (Ar-87% et O₂-13%), les disques de PET tissé ont été exposés pendant différents temps allant de 0 à 600 secondes. La procédure de mesure a été répétée 5 fois par type d'échantillons. La

présence de groupements hydroxyles, peroxydes et hydroperoxydes conférée par le traitement plasma froid est corrélée au caractère hydrophile du substrat traité.

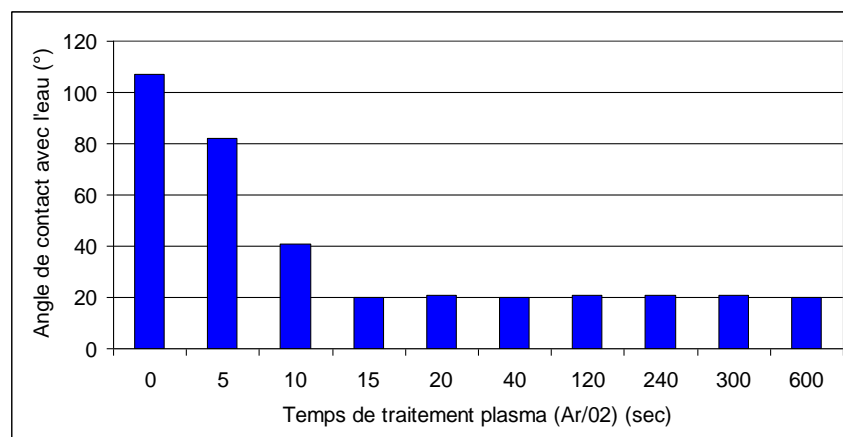


Figure 87: Mesure de l'angle de goutte pour différents temps d'exposition au plasma froid.

L'efficacité du traitement plasma froid peut être mesurée par le degré de mouillabilité des échantillons de PET traité. La mouillabilité du PET appréciée par la mesure de l'angle de goutte était optimale après une exposition de 15 à 20 secondes au plasma froid comme l'illustre la Figure 87.

4.8.1.2 Optimisation des paramètres pour le greffage du PAA

4.8.1.2.1 Influence de la température et du temps sur le greffage

Pour répondre à cette question nous avons soumis des disques de PET activés pendant 120 secondes au traitement plasma froid à une solution d'acide acrylique à 2,5 M. Cette expérience a été répétée à différentes températures (40, 60 et 80°C) pendant des temps allant de 0 à 6 heures.

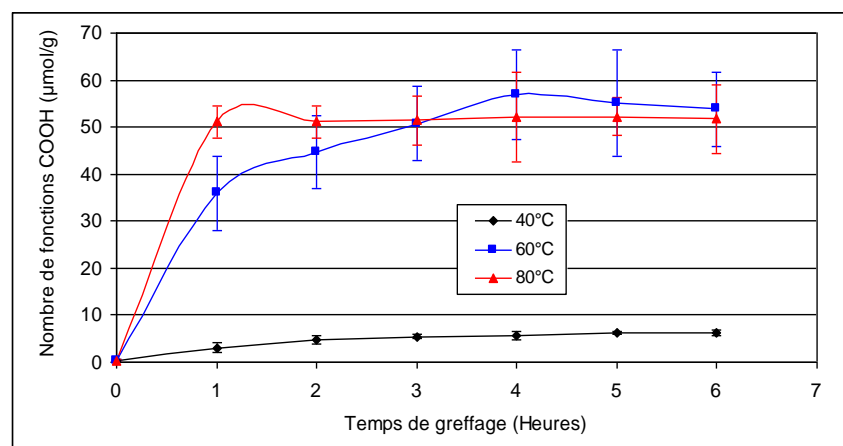


Figure 88: Dosage par spectrophotométrie UV (634 nm) des fonctions COOH pour diverses températures du bain d'AA et divers temps de greffage.

La Figure 88 montre que l'immersion des échantillons de PET activés dans un bain d'AA à 80°C pendant au moins deux heures permettait d'obtenir le meilleur taux de greffage. Pour la suite des expériences nous avons retenu par conséquent un temps d'immersion de 4 heures par sécurité et une température de 80°C. Une équivalence entre le temps et la température de greffage était observée, dès lors que la température seuil de 60°C était franchie (température minimale pour greffer l'AA sur les fonctions peroxydes). En effet, alors qu'un temps de 2 heures est suffisant à 80°C, il faut environ 4 heures de greffage à 60°C pour obtenir le même taux de greffage (un échantillon de PET-AA à environ 50 μmol de COOH (PAA) par gramme de PET).

4.8.1.2.2 Influence de la concentration en AA sur le greffage

En vue de déterminer l'influence de la concentration d'AA sur le taux de greffage, des échantillons de PET activés au plasma froid (120 secondes), ont été immergés à 80°C pendant 4 heures dans des solutions d'acide acrylique à 0 M, 0,5 M, 2,5 M, et 5 M.

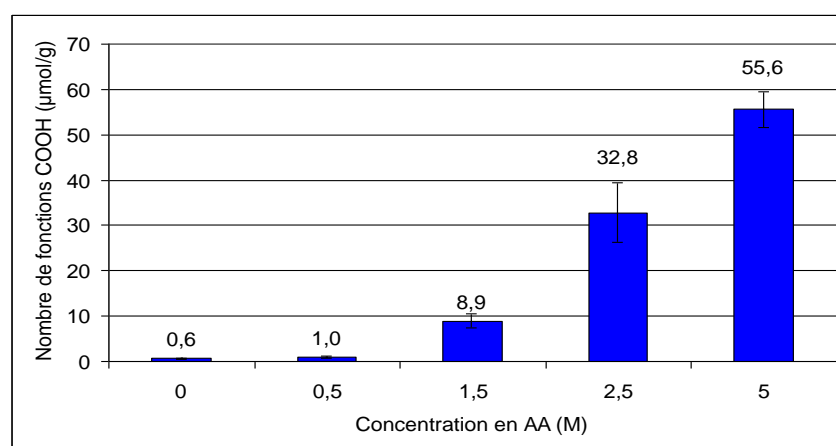


Figure 89: Dosage TBO des fonctions COOH (Taux de greffage en $\mu\text{mol/g}$) par spectrophotométrie UV (634 nm) pour diverses concentrations d'acide acrylique (n=5).

La Figure 89 montre le nombre de fonctions COOH greffées sur les échantillons au cours de cette expérience. Il apparaît que plus la concentration d'AA était élevée, plus le nombre de fonctions COOH greffées sur le PET était important avec constatation cependant d'un phénomène d'homopolymérisation (formation d'un gel) dans le bain à partir d'une concentration d'AA à 5M.

4.8.2 Caractérisation physique du greffage

4.8.2.1 Energie de surface

Dans le but de déterminer l'influence du greffage sur l'énergie de surface du PET, les échantillons obtenus dans les conditions de l'expérience précédente ont été soumis à un test de mouillabilité. L'angle de goutte a été mesuré. La copolymérisation greffante de l'AA sur le PET (PET-AA) améliorait l'hydrophilie du PET comme l'illustre la Figure 90.

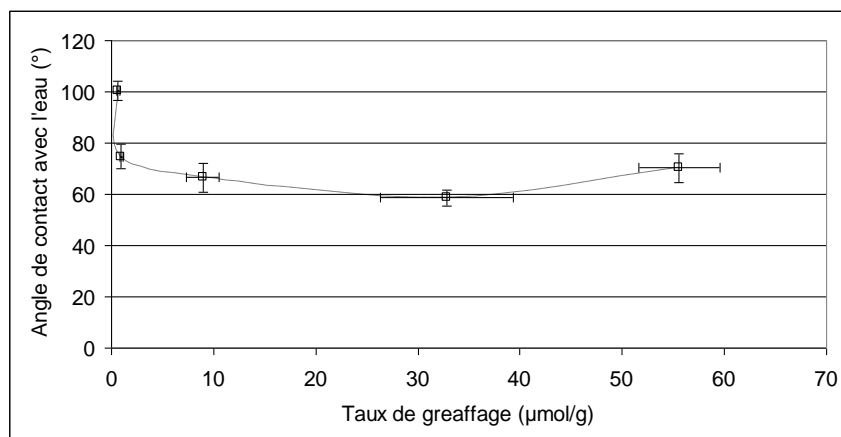


Figure 90: Angle de goutte mesuré en fonction du taux de greffage exprimé en µmol d'acide acrylique par gramme de PET.

En effet, dès le taux de 1 µmol/g de fonctions COOH (AA 0,5M), l'angle de contact avec l'eau devenait significativement plus faible, dû au traitement plasma froid et à la présence de groupements carboxyles (COOH) hydrophyles. Ce caractère plus hydrophile était optimum pour un taux de 32,8 µmol/g de fonctions COOH, soit le taux obtenu avec un bain de greffage à l'AA 2,5 M. A noter que les taux de greffage notifiés sur la Figure 90 correspondent aux taux obtenus avec respectivement le PET et les PET-AA à 0,5 M, 1,5 M, 2,5 M et 5 M (depuis l'axe des Y).

4.8.2.2 Analyse thermo-gravimétrique

La présence des greffons de PAA sur les échantillons de PET a été confirmée pour chaque concentration par analyse thermogravimétrique (ATG). Les échantillons étaient passés de la température ambiante à 800°C à une vitesse de 10°C par minute, dans un four sous flux constant d'azote à 100 mL/min. Cette analyse permet de déterminer le taux de greffage grâce à la perte de masse.

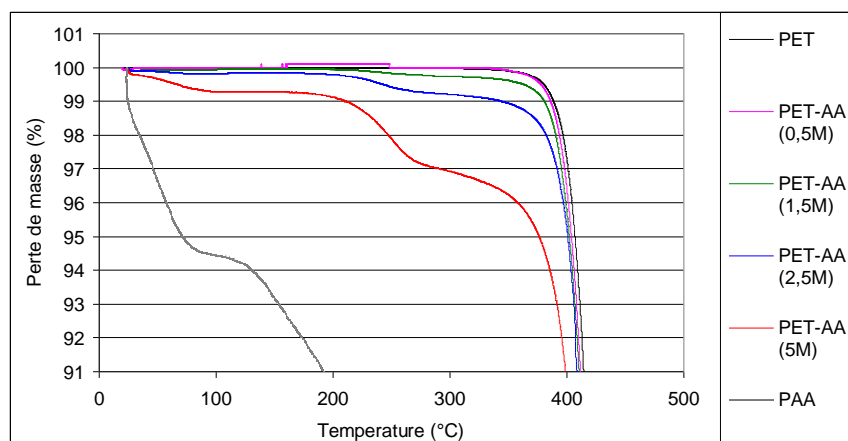


Figure 91: analyse thermo-gravimétrique de l'acide polyacrylique (PAA), du PET et du PET-AA à différentes concentrations d'AA.

La courbe de variation de masse du PET greffé se rapprochait d'autant de celle du polymère d'acide acrylique (homopolymère) que la concentration en AA dans le bain de greffage était élevée. Il existait donc une plus forte concentration de groupements COOH sur les PET greffés respectivement à 5 M, 2,5 M, et 1,5 M alors que la courbe du PET greffé à 0,5 M était quasiment superposable à celle du PET (Figure 91). Ces résultats concordent avec ceux obtenus par le dosage TBO des fonctions COOH.

4.8.2.3 Analyse en microscopie à force atomique

L'analyse en microscopie à force atomique (AFM) montra que le traitement plasma froid avait changé considérablement la topologie de surface du PET. La Figure 92a montre la surface lisse et régulière du PET vierge observé en AFM. Cette surface était devenue rugueuse après le traitement plasma froid. Des stries linéaires régulières créées par ce traitement physique pouvaient être observées (Figure 92b). A noter que ces lignes se dessinaient dans une seule direction et que la distance entre elles était régulière.

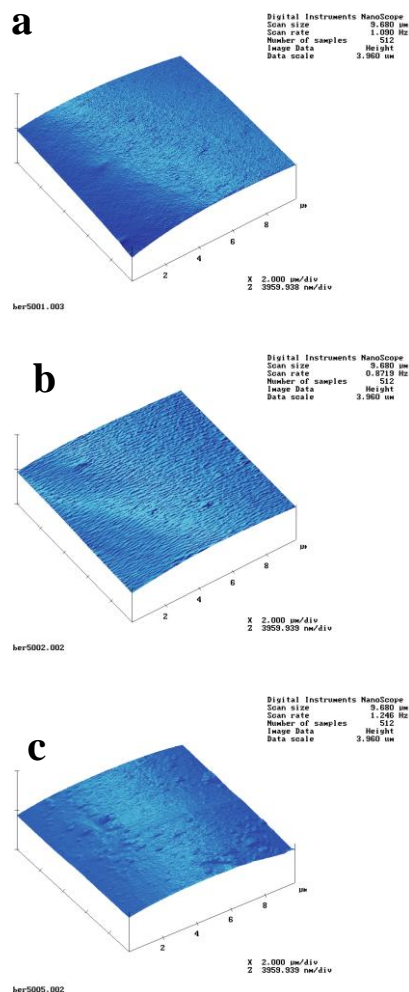


Figure 92 : Images obtenues en AFM du PET (a), du PET-PF (b) et du PET-AA PAA (c) (conditions du greffage: 80°C, 4 heures, AA 2.5 M) après traitement plasma froid (Ar/O₂ – 85%/15%, 120 sec, 300 Watts)

La Figure 92c montre la disparition de cet aspect régulier des lignes à la surface du PET traité plasma froid une fois le greffage du polymère d'acide acrylique réalisé. Une surface plutôt rugueuse était en effet observée en AFM sur tous les échantillons greffés à l'acide polyacrylique et pour quelque soit la concentration de la solution de greffage (Données non montrées). Pour mémoire, il n'y avait pas de différence dans la rugosité de la surface entre ces différents échantillons greffés à l'acide acrylique.

4.8.2.4 Analyse en microscopie électronique à balayage

Pour caractériser davantage les échantillons obtenus dans les conditions de l'expérience précédente, une analyse par Microscopie Électronique à Balayage (MEB) a été réalisée. La

Figure 93 montre une surface des disques de PET et de PET-AA à différentes concentrations d'acide acrylique (0M, 0,5M, 1,5M, 2,5M et 5M).

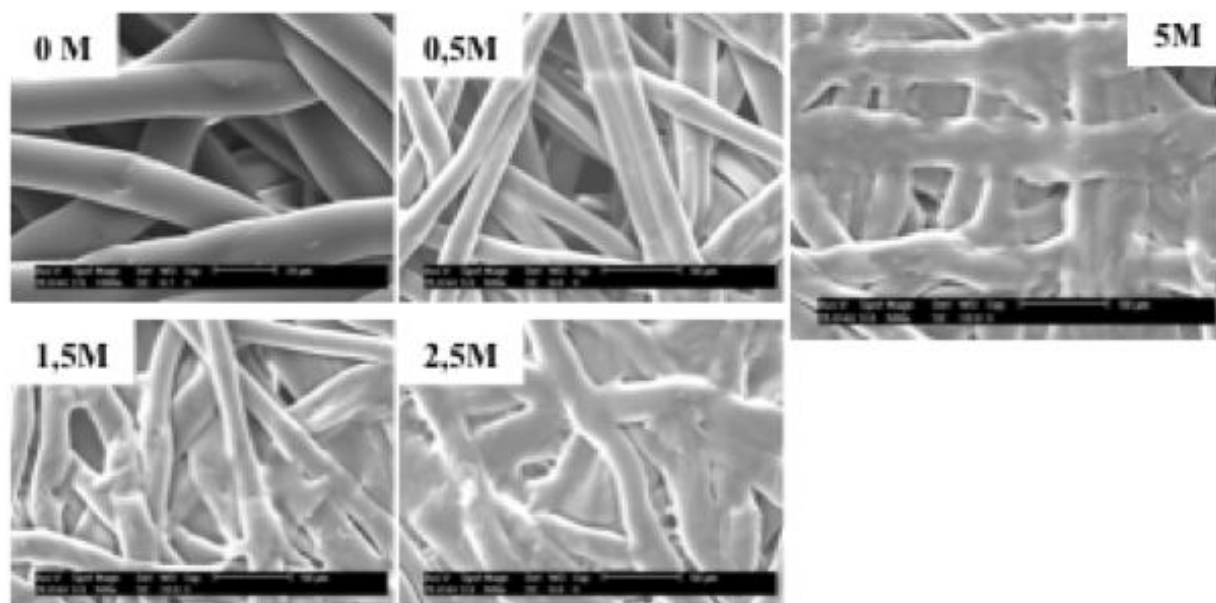


Figure 93: Vue de surface des échantillons de PET par microscopie électronique à balayage.

La surface du PET-AA devenait très hétérogène quand la concentration d'AA était supérieure ou égale à 5 M (55,6 $\mu\text{mol/g}$ de fonctions COOH) suggérant une influence négative de l'homopolymérisation observée dans le bain pendant le greffage. A noter qu'en dessous de 0,5 M, il y avait très peu de fonctions COOH sur le PET comme révélé par dosage TBO au spectrophotomètre UV (Figure 89). La concentration optimale d'AA pour le greffage a donc été fixée à 2,5 M (32,8 $\mu\text{mol/g}$ de fonctions COOH).

4.8.2.5 Les essais mécaniques

Les propriétés mécaniques du PET vierge et du PET greffé à l'acide polyacrylique à 2,5M étaient évaluées par la mesure de la force tensile (Figure 94).

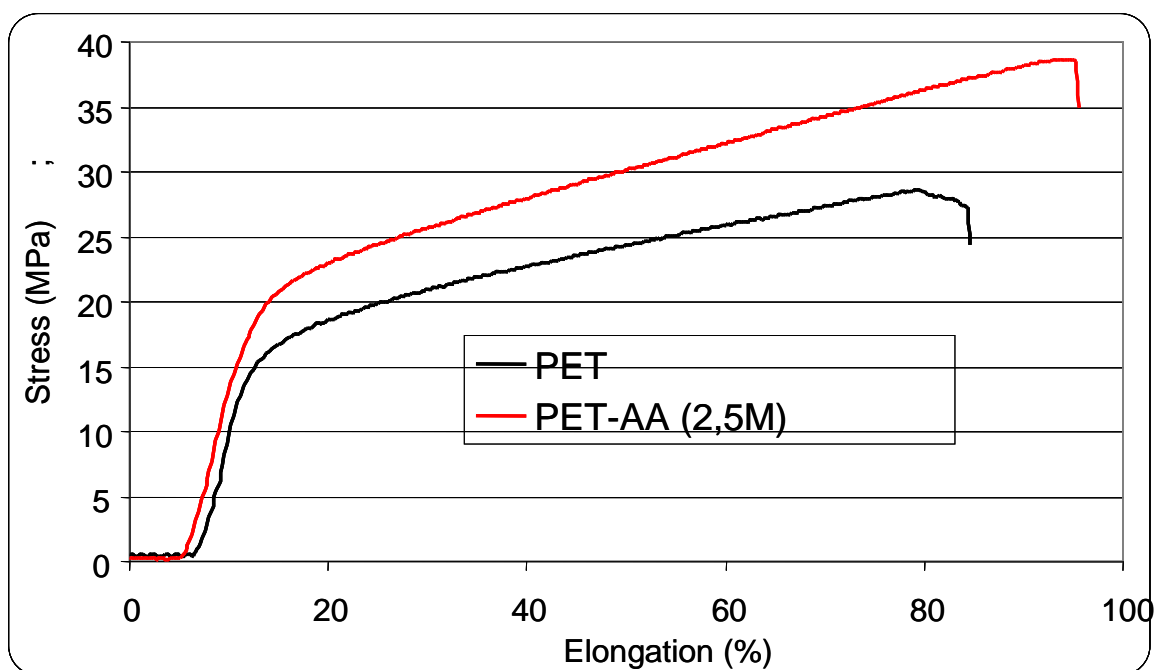


Figure 94 : Courbe de traction du PET vierge (PET) et du PET greffé à l'acide polyacrylique à une concentration de 2,5M (PET-AA 2,5M)

La contrainte d'élongation maximale supportée par les échantillons était respectivement de 84% et 95% pour le PET vierge et le PET greffé à l'acide polyacrylique (PET-AA). De façon similaire le stress maximum en étirement circonférentiel passait de 25Mpa pour le PET vierge à 35MPa pour le PET-AA (2,5M). Le greffage de l'acide poly(acrylique) a permis d'augmenter la résistance mécanique du PET à la traction longitudinale et à la traction circonférentielle. Bien qu'il ne s'agisse pas de différences très importantes, l'incidence éventuelle de ces changements, notamment sur la compliance des prothèses vasculaires ainsi modifiées, devra être évaluée.

4.8.3 Evaluation biologique du greffage

4.8.3.1 Cytocompatibilité du greffage

4.8.3.1.1 Effets sur les cellules endothéliales

Les échantillons de PET tissé ont été modifiés selon les conditions optimales de traitement plasma froid (120 secondes) et de greffage (Température = 80°C ; Temps = 4 heures). Des disques découpés de ces échantillons étaient mis dans des boîtes Costar® 24-puits puisensemencées de cellules endothéliales (HUVEC). Un test de cytotoxicité par la mesure de la vitalité cellulaire a été réalisé. La Figure 95 montre les effets à 3 jours et à 6 jours du traitement plasma froid et du greffage du polymère d'acide acrylique à la surface du PET sur

les cellules endothéliales (HUVEC). Après 3 jours d'exposition, le taux de vitalité des HUVEC avait significativement diminué sur tous les supports comparés au témoin négatif TCPS ($P < 0,001$; test de Bonferroni-Dunn). Cette diminution était du même ordre de grandeur sur toutes les prothèses vasculaires en PET greffées avec l'acide acrylique et notamment sur le PET greffé à 2.5M comparé au PET vierge ($P = 0,11$; test de Bonferroni-Dunn). Ce qui témoigne d'une cytocompatibilité identique à 3 jours de contact avec les cellules endothéliales du PET modifié et du PET vierge.

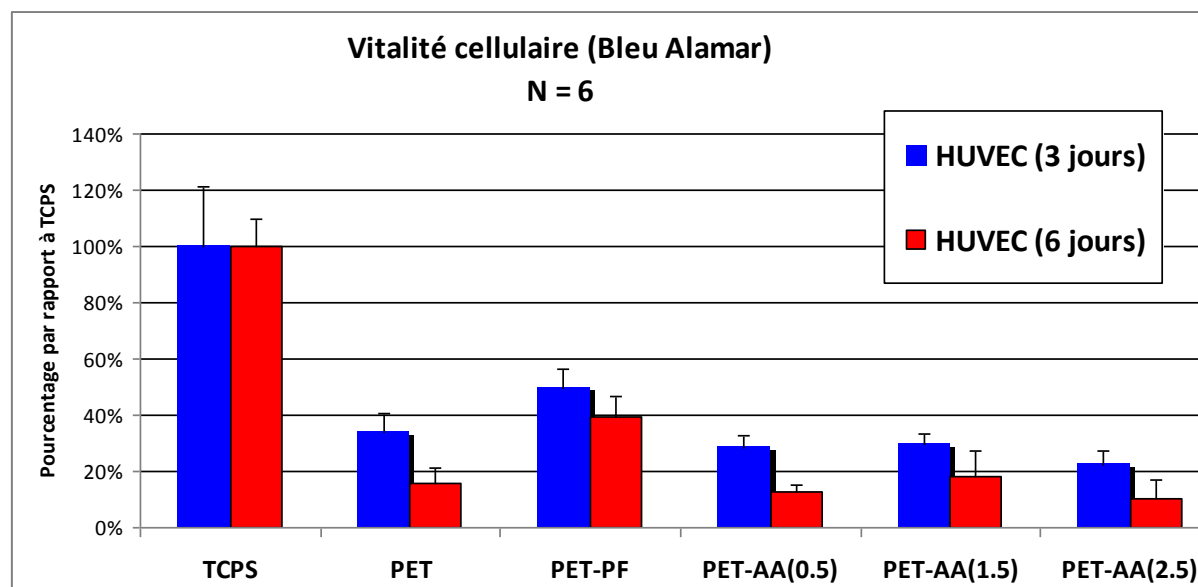


Figure 95 : Etude de la vitalité des HUVEC après 3 et 6 jours de prolifération sur différents supports selon la méthode du Bleu Alamar.

A J6 de prolifération des HUVEC au contact des échantillons (Figure 95), les résultats restèrent inférieurs pour l'ensemble des groupes testés comparés au témoin négatif TCPS ($P < 0,0001$; test de Bonferroni-Dunn). Comme à 3 jours, il n'y avait pas de différence de vitalité significative à J6 entre le PET vierge et les PET greffés avec l'acide acrylique quelque soit le taux de greffage, témoignant d'une cytocompatibilité identique à 6 jours de contact. Une amélioration significative (test de Bonferroni-Dunn) de la vitalité cellulaire des HUVEC à 6 jours était toutefois notée sur le PET traité au plasma froid seulement comparé au PET vierge ($P < 0,0001$) et comparé au PET greffé au polymère d'acide acrylique à 2,5M ($P < 0,0001$).

4.8.3.1.2 Effets sur les cellules musculaires

Les échantillons de PET tissé ont été modifiés selon les conditions optimales de traitement plasma froid (120 secondes) et de greffage (Température = 80°C ; Temps = 4 heures). Des

disques découpés de ces échantillons étaient mis dans des boîtes Costar® 24-puits puis ensemencées de cellules musculaires lisses (HPASMC). Un test de cytotoxicité par la mesure de la vitalité cellulaire a été réalisé. La Figure 96 montre les effets à 3 jours et à 6 jours sur les cellules musculaires lisses (HPASMC) du traitement plasma froid et du greffage du polymère d'acide acrylique à la surface du PET.

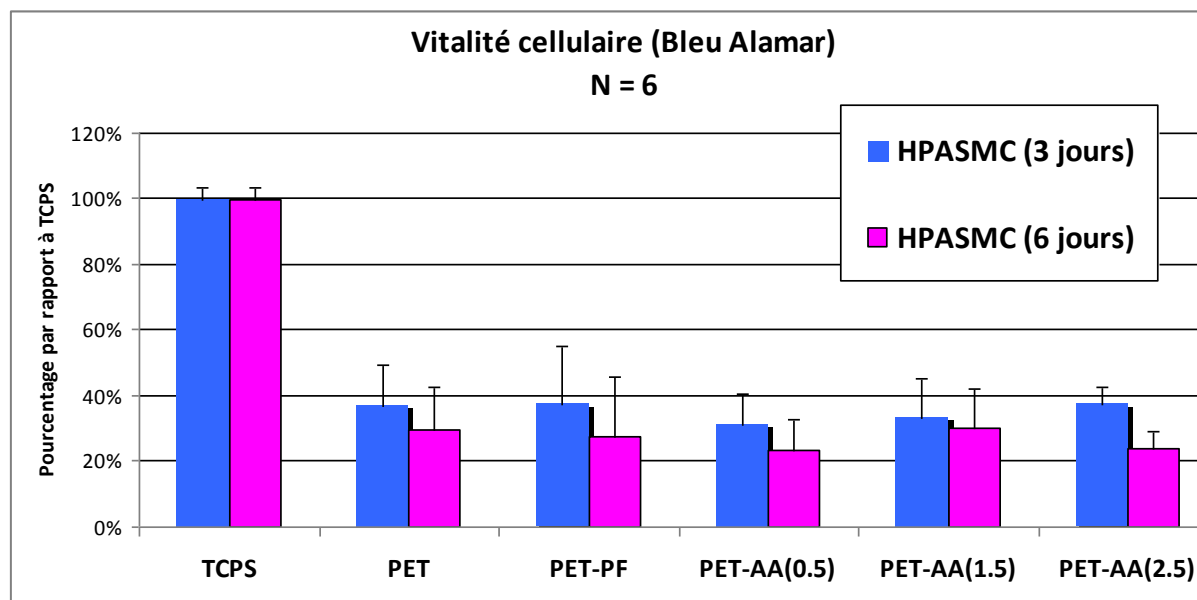


Figure 96 : Etude de la vitalité des HPASMC selon la méthode du Bleu Alamar après 3 et 6 jours de prolifération sur différents supports

La vitalité des HPASMC à 3 jours (Figure 96) avait aussi significativement diminué sur tous les groupes d'échantillons testés comparés au témoin négatif ($P < 0,0001$; test de Bonferroni-Dunn). La vitalité des HPASMC était comparable entre les échantillons de PET vierge et les échantillons de PET traités par plasma froid ($P=0,97$) ou de PET greffés avec l'acide acrylique à 2,5M ($P=0,94$; test de Bonferroni-Dunn). Comme pour le HUVEC, il n'y avait pas de différence de vitalité significative à 3 jours pour les HPASMC entre les PET greffés avec l'acide acrylique quelque soit le taux de greffage.

Quant aux résultats à 6 jours, la vitalité cellulaire des HPASMC (Figure 96) resta comme à 3 jours également abaissée sur les échantillons traités plasma froid ($P=0,78$; test de Bonferroni-Dunn) ou greffés avec l'acide acrylique à 2,5M ($P=0,40$; test de Bonferroni-Dunn) comparés au témoin négatif TCPS (test de Bonferroni-Dunn). Comme à 3 jours, il n'y avait pas à 6 jours de différence statistiquement significative sur la vitalité des HPASMC entre les échantillons de PET vierge et les échantillons de PET greffés avec l'acide acrylique ou traités seulement au plasma froid ($P=0,78$; test de Bonferroni-Dunn).

Pris dans leur ensemble à 3 jours et à 6 jours, sur HUVEC et sur HPASMC, les résultats de ces expérimentations témoignent d'une cytocompatibilité identique du PET vierge comme il est actuellement en usage clinique et du PET modifié par le greffage de l'acide poly(acrylique).

4.8.3.2 Hémocompatibilité du greffage

4.8.3.2.1 Index hémolitique au contact du sang total

La Figure 97 montre le taux d'hémolyse observé après exposition du sang total d'un donneur sain volontaire à des échantillons de prothèse vasculaire modifiée. Après une heure d'exposition, il n'existe pas d'hémolyse provoquée par le greffage de l'acide acrylique sur les prothèses en PET-AA quelque soit le taux de greffage.

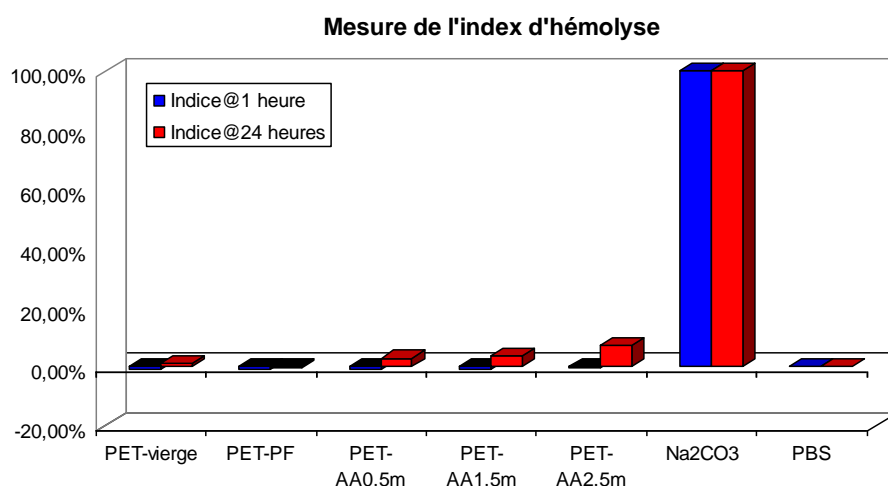


Figure 97 : Index d'hémolyse du sang total au contact de divers échantillons de PET (Temps : 1heure ; 24 heures).

L'indice d'hémolyse était $< 5\%$ pour tous ces échantillons comme pour le PET vierge et le témoin négatif (le PBS) alors qu'il était maximum (100%) avec le témoin positif (Na_2CO_3). En revanche, après 24 heures d'exposition, l'index d'hémolyse augmente progressivement en fonction du nombre de fonctions COOH présents sur les supports en PET (Figure 97) pour atteindre 7% avec le PET-AA greffé à 2.5M. Ces valeurs d'indice restent néanmoins comparables aux mesures obtenues avec le PET vierge (1%) et nettement inférieures à celles du carbonate de sodium (100%). De plus, les groupements carboxyles potentiellement responsables de la relative augmentation de l'indice d'hémolyse du PET-AA par rapport au

PET vierge devraient être occupés par des molécules bioactives ou par l'agent espaceur les rendant non disponibles pour interagir avec les globules rouges.

4.8.3.2.2 Effets sur l'adhésion plaquettaire

La Figure 98 montre les résultats de l'étude de l'adhésion plaquettaire sur des prothèses vasculaires en PET greffé avec l'acide acrylique comparées aux prothèses vasculaires en PET vierge telles qu'elles existent actuellement. Cette étude a démontré une réduction significative du nombre de plaquettes pouvant adhérer sur le PET après un greffage d'acide acrylique à 2.5M comparée à la prothèse vierge ($P= 0,004$; test de Bonferroni-Dunn). Cet effet semble dépendre du taux de greffage. On pouvait déjà noter une amorce de réduction de l'adhésion plaquettaire avec les échantillons greffés à 1.5M quoique non significative par rapport au PET vierge ($P>0,05$).

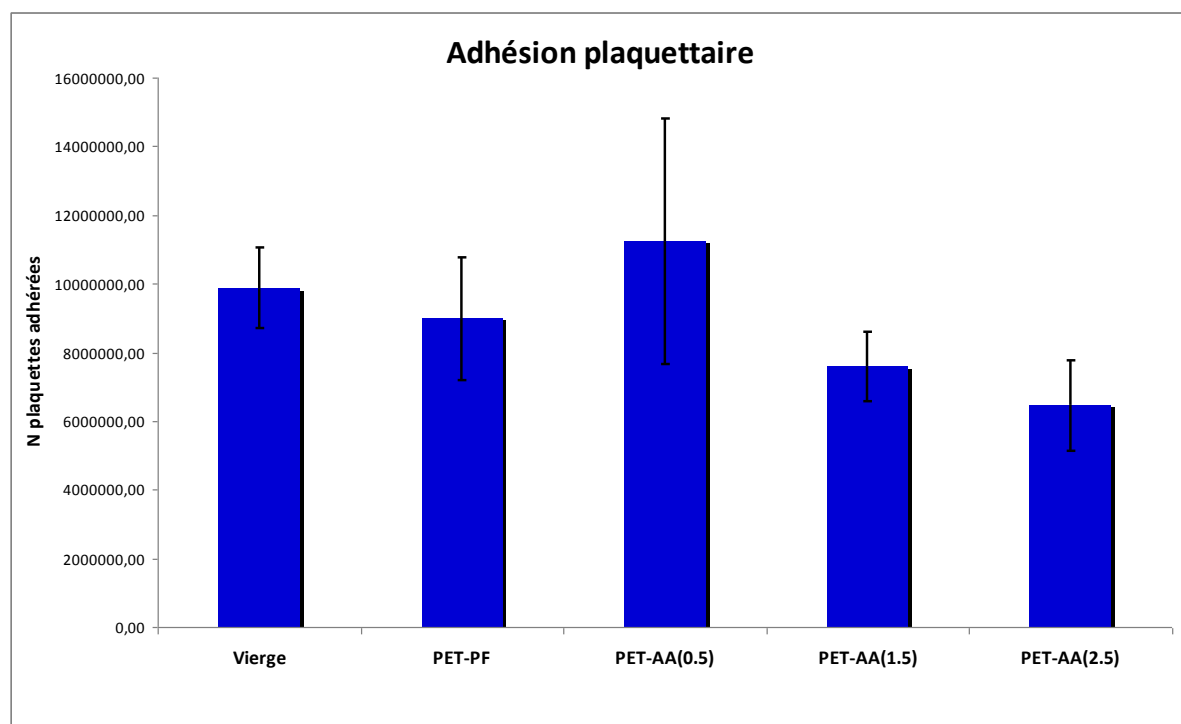


Figure 98 : Etude de l'adhésion plaquettaire sur différents supports

4.8.3.2.3 Effets sur la cinétique d'agrégation plaquettaire

Les plaquettes sanguines avaient beaucoup moins tendance à s'agréger au contact du PET greffé avec l'acide acrylique à 2.5M. Cet effet est néanmoins absent avec les taux de greffage obtenus pour des concentrations inférieures d'acide acrylique (Figure 99).

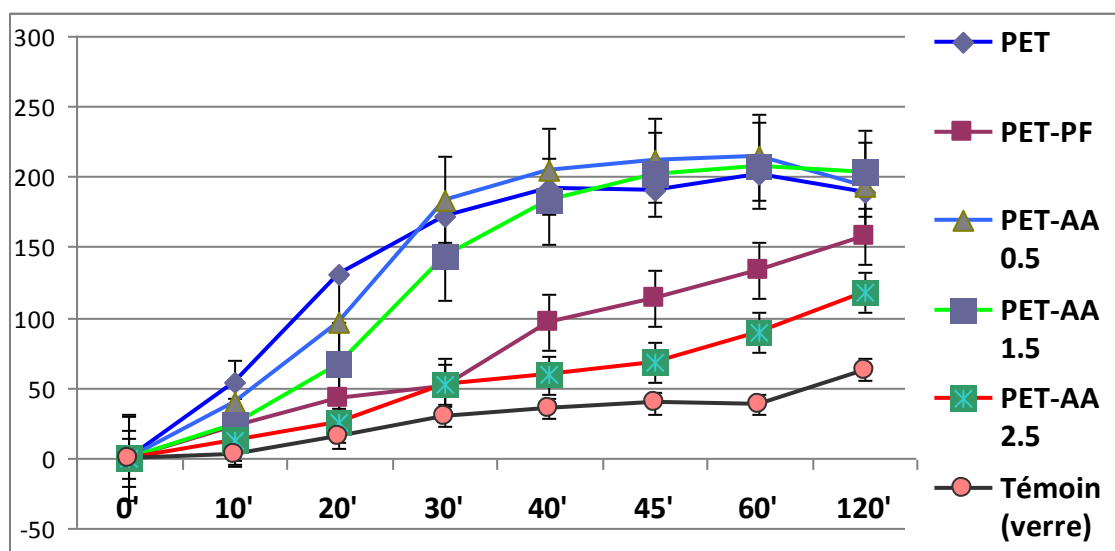


Figure 99 : Mesure de la cinétique d'agrégation plaquettaire au contact de différents supports

La cinétique d'agrégation plaquettaire sur les différents supports confirme les résultats obtenus lors des expériences précédentes sur l'adhésion plaquettaire (Figure 99).

4.8.3.3 Bilan du greffage en vue de la fixation de molécules bioactives

Au terme des expériences précédentes, les échantillons que nous avons considérés comme optimaux pour fixer une molécule bioactive étaient ceux préparés après 120 secondes de traitement plasma froid puis greffés dans l'AA à 2,5 M, pendant 4 heures à 80°C. Ces échantillons étaient plus stables et plus hydrophiles avec de meilleures caractéristiques physicochimiques que le PET vierge et les autres. Ils avaient la meilleure homogénéité de surface et un nombre important de fonctions COOH disponibles pour fixer un maximum de molécules bioactives. Ces échantillons avaient montré déjà des propriétés biologiques intéressantes en ce sens qu'elles étaient hémocompatibles et cytocompatibles. Ils démontraient même des résultats encourageants sur l'adhésion plaquettaire ainsi que sur la cinétique d'agrégation plaquettaire.

4.8.4 Immobilisation de la molécule thérapeutique

4.8.4.1 Immobilisation de la simvastatine

4.8.4.1.1 Caractérisation par ATG de la fixation de la simvastatine sur le PET

Des échantillons de PET-AA et de PET vierge ont été soumis au même protocole de fixation de molécule bioactive en vue d'immobiliser la simvastatine. Une étude de ces échantillons a

été réalisée par ATG entre 50 et 550 °C à une vitesse de 10 °C par minute. Les résultats sont rapportés sur la Figure 100.

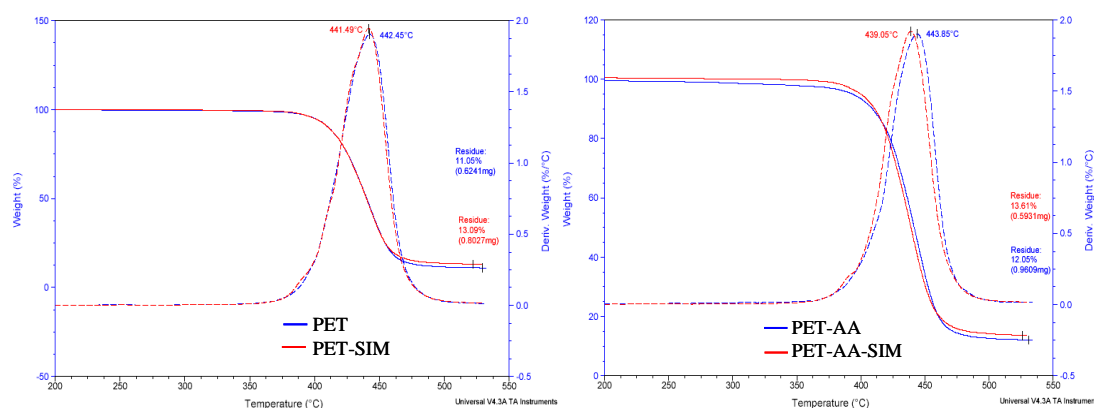


Figure 100 : Analyse par thermogravimétrie. A Gauche : PET vierge (PET) et PET soumis au protocole d'immobilisation de la simvastatine sans greffage préalable de fonctions COOH (PET-SIM). A Droite : PET greffé à l'acide polyacrylique à 2,5M (PET-AA) et PET-AA soumis au protocole d'immobilisation de la simvastatine (PET-AA-SIM)

Un léger déplacement de la température de dégradation thermique du PET-AA fonctionnalisé par greffage de la simvastatine (PET-AA-SIM) a été observé comparé au PET-AA (Figure 100). Ce qui suggère, toute chose étant égale par ailleurs, la présence de la simvastatine sur les échantillons PET-AA-SIM (Figure 100). Cette observation est complétée par l'absence de différence entre le PET vierge non traité et le PET soumis au même protocole d'immobilisation de la simvastatine.

Nous pouvons donc en conclure que la simvastatine s'était bien fixée sur le PET-AA et non sur le PET. La présence des fonctions COOH apportées par le greffage à l'acide acrylique paraît déterminante pour cette fixation.

4.8.4.1.2 Effets biologiques de la simvastatine fixée sur le PET-AA

4.8.4.1.2.1 Sur les cellules endothéliales et musculaires lisses

Dans le but d'évaluer l'influence de la fixation de la simvastatine sur les propriétés biologiques du PET fonctionnalisé, des échantillons de PET, de PET-AA, et de PET-AA-SIM ont été mis en contact avec des HPMECs et des HPASMC pendant 3 et 6 jours. Un test de cytotoxicité par la méthode du Bleu alamar a été réalisé. La Figure 101 résume les résultats de cette expérience.

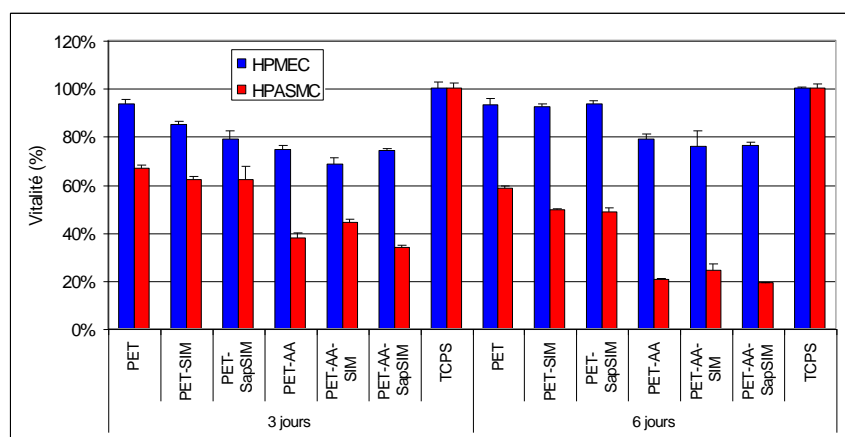


Figure 101 : étude de la vitalité des HPMEC et des HPASMC en présence de différents supports

Après 3 jours d'exposition des cellules sur les supports, le taux de vitalité des HPMEC avait diminué sur le PET-AA et sur le PET-AA-SIM par rapport au PET vierge.

Cet effet, sur les HPMEC, était néanmoins faible comparé à l'effet noté sur les HPASMC avec les 3 classes d'échantillons ayant été greffés avec l'AA (PET-AA, PET-AA-SIM, PET-AA-SapSIM).

La fixation de la simvastatine sur le PET (PET-SIM) entraînait à J3 une réduction faible du taux de vitalité des HPMEC par rapport au PET vierge mais n'avait pas d'action sur les HPASMC.

A J6 de prolifération, les 3 classes d'échantillons ayant été greffés avec le PAA induisaient par rapport au PET vierge une réduction encore plus marquée de la vitalité des HPASMC.

La vitalité des HPMEC à J6 était revenue au niveau du PET vierge avec le PET-SIM, et gardait son niveau de 3 jours avec le PET-AA et le PET-AA-SIM.

Au total, à J3 comme à J6, les échantillons greffés avec l'AA fonctionnalisés ou non avec la simvastatine exerçaient sur les HPASMC et les HPMEC une cytotoxicité différentielle plus marquée par rapport aux autres échantillons témoin. A noter que la différence de vitalité était en faveur des HPMEC. Au cours de cette expérience, la présence de la molécule bio-active fixée sur le PET-AA ne provoquait aucune différence par rapport au PET-AA.

4.8.4.1.2.2 Sur l'adhésion plaquettaire

L'étude de l'adhésion plaquettaire sur les différents supports confirme les résultats obtenus lors des essais précédents.

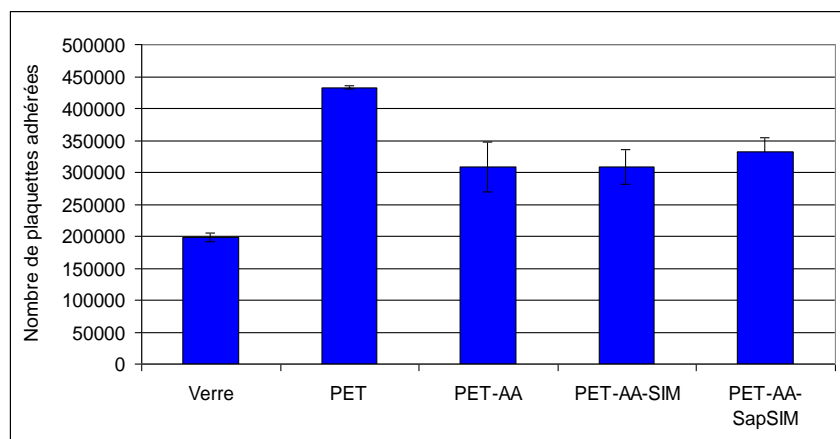


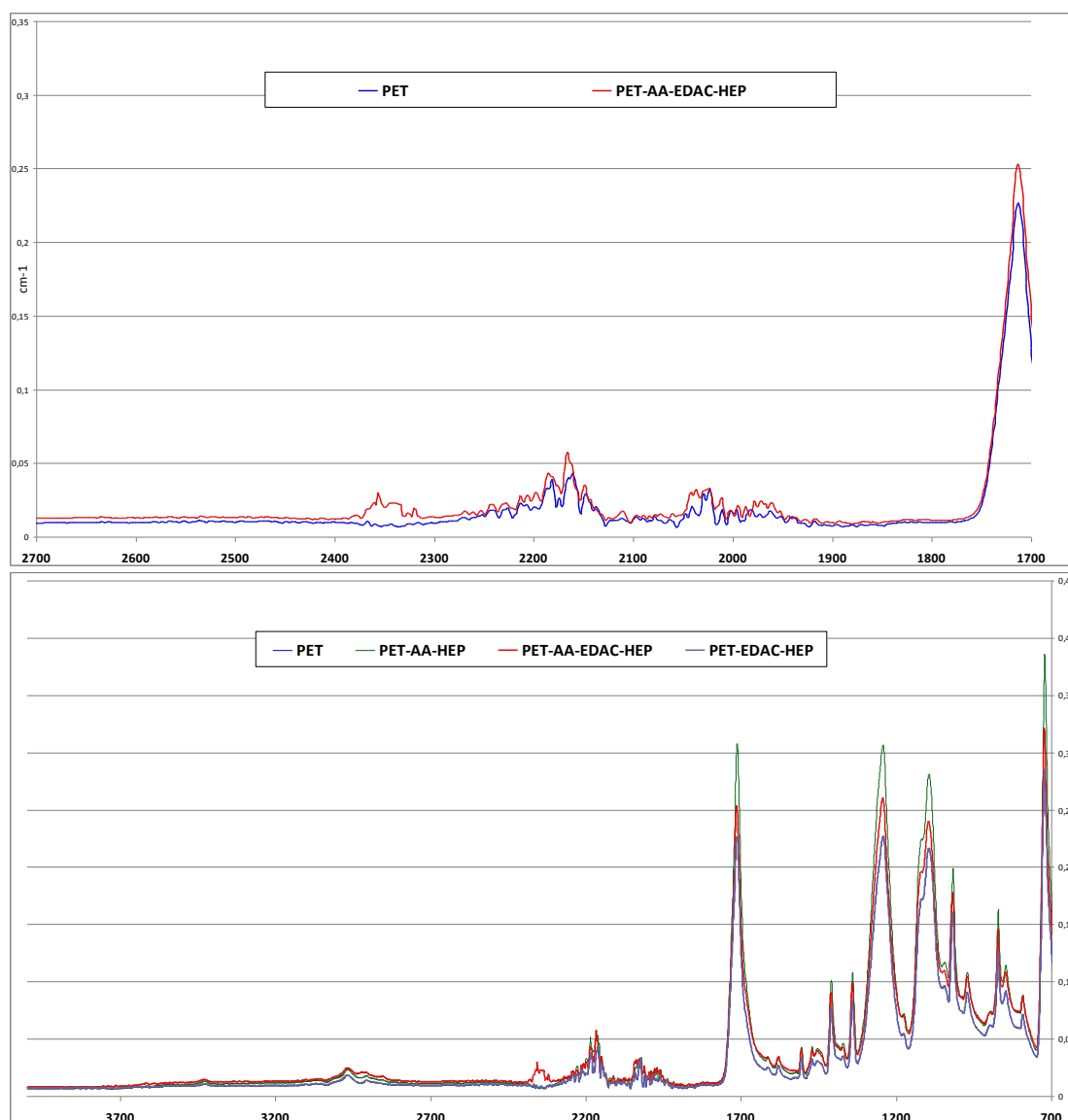
Figure 102: Etude de l'adhésion plaquettaire sur différents supports

Le PET greffé avec l'AA, fonctionnalisé ou non avec la simvastatine, réduisait significativement l'adhésion plaquettaire (**Figure 102**). Ce qui suggère encore un bénéfice du revêtement du PET avec l'AA.

4.8.4.2 Immobilisation de l'héparine

4.8.4.2.1 Caractérisation par spectroscopie infrarouge de la fixation de l'héparine

L'analyse infrarouge a été réalisée sur les échantillons de PET vierge (témoin) et de PET-AA qui ont été soumis au protocole d'immobilisation de l'héparine en présence d'EDAC (PET-AA-EDAC-HEP). Dans le but de déterminer l'effectivité du procédé réactionnel d'immobilisation mis en route, des échantillons de PET vierge-EDAC-Héparine et de PET-AA-Héparine ont été aussi analysés en spectroscopie infrarouge. La Figure 103 présente les spectres enregistrés pour ces échantillons.



**Figure 103 : Spectre infrarouge des échantillons de PET et de PET-AA –EDAC-Héparine.
(Haut : spectre entre 2700 et 1700 cm⁻¹ ; bas: spectre global)**

L'héparine étant un composé constitué d'unités tri sulfatées affiche quand elle est présente un pic caractéristique des atomes de soufre en spectroscopie infrarouge. Les sulfonates et les thiols sont en cela remarquables par l'existence d'une bande assez faible autour de 2560 cm⁻¹. La Figure 103 montre une différence notable dans les spectres obtenus entre 2700 et 2250 cm⁻¹. Nous avons en effet noté vers 2400 cm⁻¹ l'apparition d'un pic seulement sur le spectre du PET greffé à l'acide polyacrylique et soumis au protocole d'immobilisation de l'héparine en présence d'EDAC (PET-AA-EDC-Héparine). Ce qui suggère fortement l'immobilisation effective en présence d'EDAC des molécules d'héparines sur la surface seulement du PET greffé à l'acide acrylique.

4.8.4.2.2 Effets de la fixation de l'héparine sur l'hydrophilie du PET

Dans le but de caractériser davantage la fixation de l'héparine sur le PET-AA nous avons évalué l'énergie de surface par la mesure de l'angle de goutte pour des échantillons de PET vierge (témoin), de PET-AA et des groupes d'échantillons (PET et PET-AA) soumis au protocole d'immobilisation de l'héparine. Les résultats de cette expérience sont rapportés sur la Figure 104.

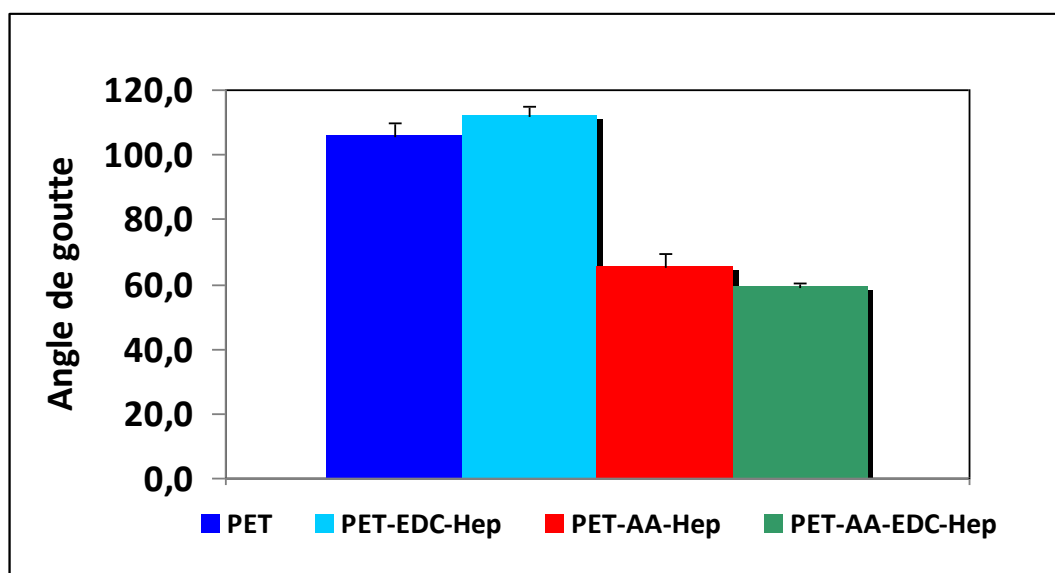


Figure 104 : Mesure de l'angle de goutte (N=8) sur les échantillons PET et PET-AA traités ou non avec le protocole d'immobilisation de l'héparine.

Il apparaît que la présence du polymère d'acide acrylique sur les échantillons était associée significativement à une augmentation du caractère hydrophile du PET. L'angle de goutte passa d'environ 100° pour le PET vierge à 66°±4° pour le PET-AA et à 59°±1° pour le PET-AA-EDC-Héparine.

4.8.4.2.3 Effets de la fixation de l'héparine sur la cinétique de coagulation

La Figure 105 montre les résultats des essais de coagulation sanguine spontanée au contact des différents substrats prothétiques évalués au cours de ces travaux. Le PET vierge provoquait quasi instantanément la coagulation du sang à son contact dans les conditions statiques de l'essai.

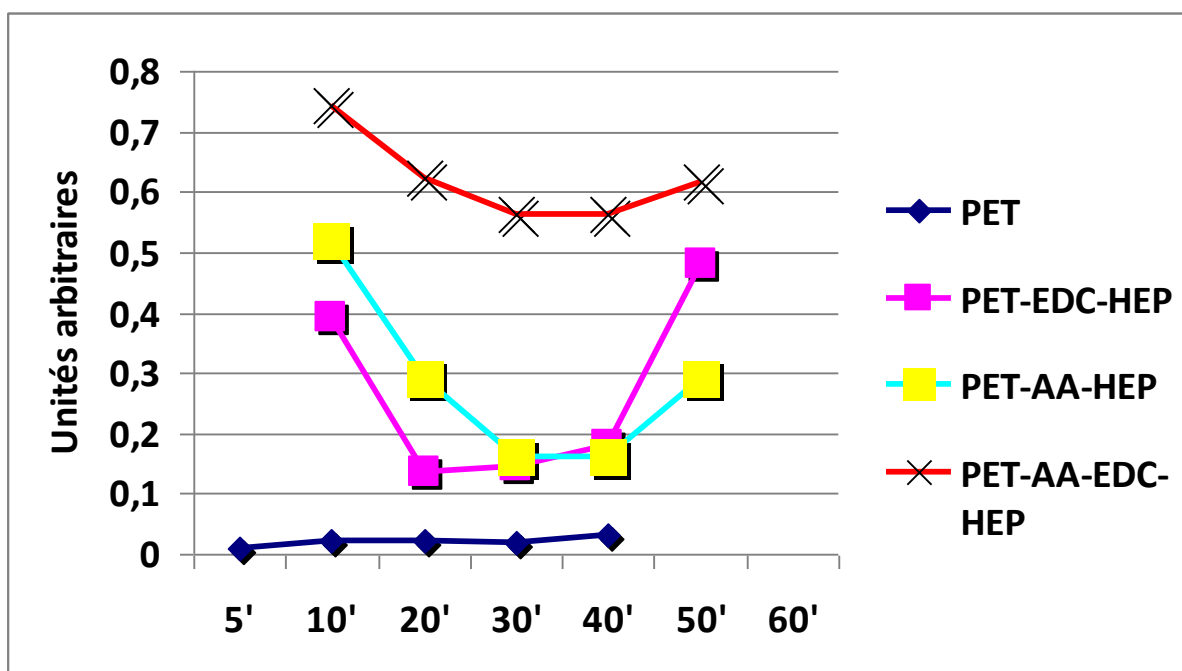


Figure 105 : Cinétique de coagulation sanguine au contact des échantillons prothétiques

La présence du polymère d'acide acrylique (PET-AA) permettait d'obtenir une amélioration de la cinétique de coagulation par rapport au PET vierge. Les échantillons de PET greffés à l'acide polyacrylique et fonctionnalisés par immobilisation de l'héparine en présence d'EDAC (PET-AA-EDC-Hep) démontraient dans les conditions statiques du test des propriétés anticoagulantes persistantes. Ce qui aussi démontre indirectement la présence effective de l'héparine immobilisée sur ces échantillons.

4.8.4.3 Immobilisation de la molécule EP224283

4.8.4.3.1 Couplage de l'agent espaceur bNH₂-PEG et de la Biotine

Dans le but d'immobiliser à la surface du PET la molécule EP224283, une étape préalable de fixation d'un spacer bNH₂-PEG puis de couplage avec une Biotine était réalisée. Nous rapportons ci dessous les résultats des expériences réalisées pour caractériser l'effectivité de ces réactions.

4.8.4.3.1.1 Caractérisation par dosage des fonctions carboxyles

Un dosage des fonctions carboxyles a été réalisé par la méthode du TBO sur les échantillons obtenus à chacune des étapes réactionnelles. Les résultats sont exprimés en μmoles / gramme de PET et résumés dans la Figure 106.

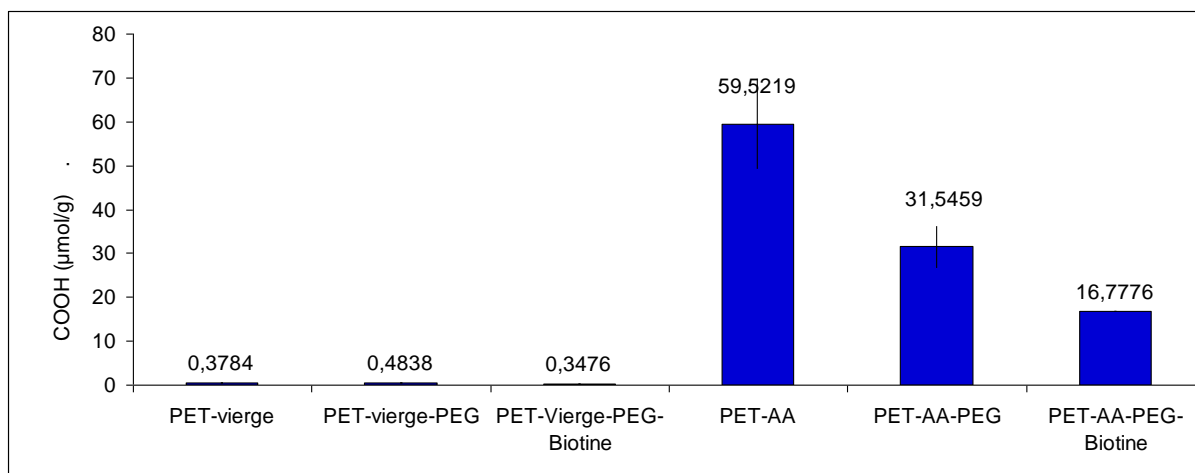


Figure 106 : Dosage TBO des fonctions carboxyles à la surface des différents échantillons de PET obtenus lors des réactions de couplage du PET avec l'espacer bNH2-PEG et le linker Biotine

Le nombre de fonctions COOH à la surface du PET était quasi identique sur le PET vierge soumis ou non aux réactions de couplage avec l'espacer bNH2-PEG et la Biotine. A l'inverse, les fonctions COOH étaient, comme attendu, en quantité significativement plus importante sur les échantillons greffés à l'acide polyacrylique (PET-AA). Quand ces échantillons PET-AA ont été soumis au procédé de fixation de l'agent espaceur via l'EDAC (PET-AA-PEG), une réduction d'environ 50% du nombre de fonctions COOH capables encore de complexer le TBO était observée. Ce qui suggère l'amidation de 50% des fonctions carboxyles par le bNH2-PEG. Le couplage effectif du bNH2-PEG à la surface du PET avec des molécules de biotine était aussi suggéré lors de cette expérience vu la baisse additionnelle observée de fonctions COOH complexées par le TBO à la surface des échantillons PET-AA-PEG-Biotine.

4.8.4.3.1.2 Caractérisation par dosage des fonctions amines

Les résultats de l'expérience précédente furent complétés par un dosage des fonctions amines à la surface des échantillons par l'acide orange (AO). Les résultats sont exprimés en nmoles de AO adsorbé par gramme de PET et résumés dans la Figure 107.

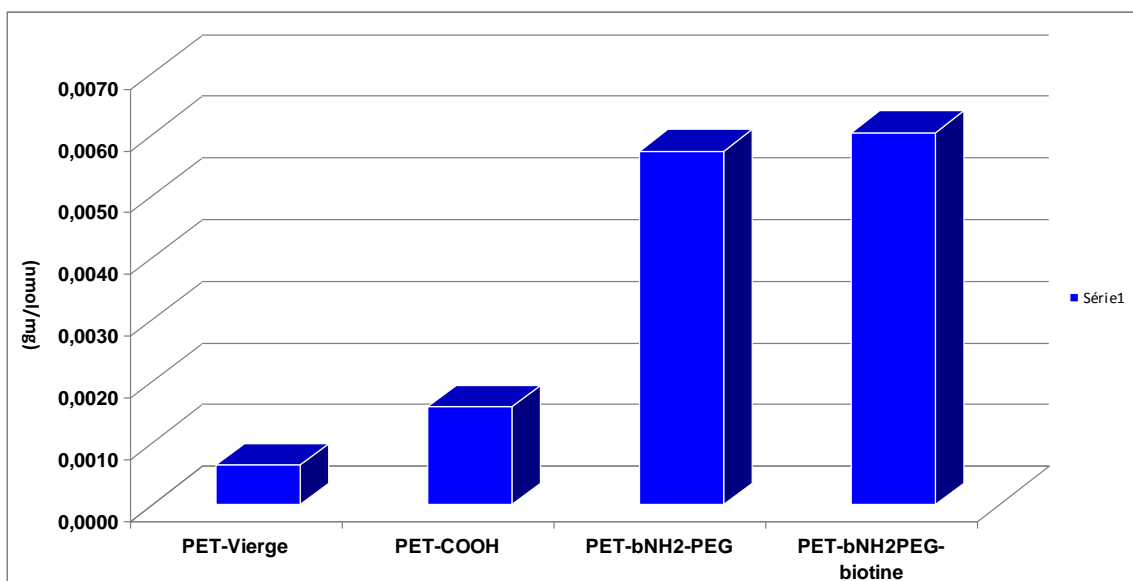


Figure 107 : Dosage des fonctions amines à la surface des échantillons par la méthode du méthylorange

Comme attendu les fonctions amines étaient mises en évidence par le méthylorange en quantité significativement plus importante sur les échantillons porteurs de l'agent espaceur bNH2-PEG à savoir le PET-AA-PEG et le PET-AA-PEG-Biotine. La réaction de couplage de l'espaceur avec le linker Biotine ne provoqua cependant aucun changement majeur dans le nombre de fonctions amines encore identifiables au dosage méthylorange.

4.8.4.3.1.3 Caractérisation par spectroscopie infrarouge

Les spectres infrarouges de PET-AA, de PET-AA-PEG et de PET-AA-PEG-Biotine étaient parfaitement superposés (Figure 107).

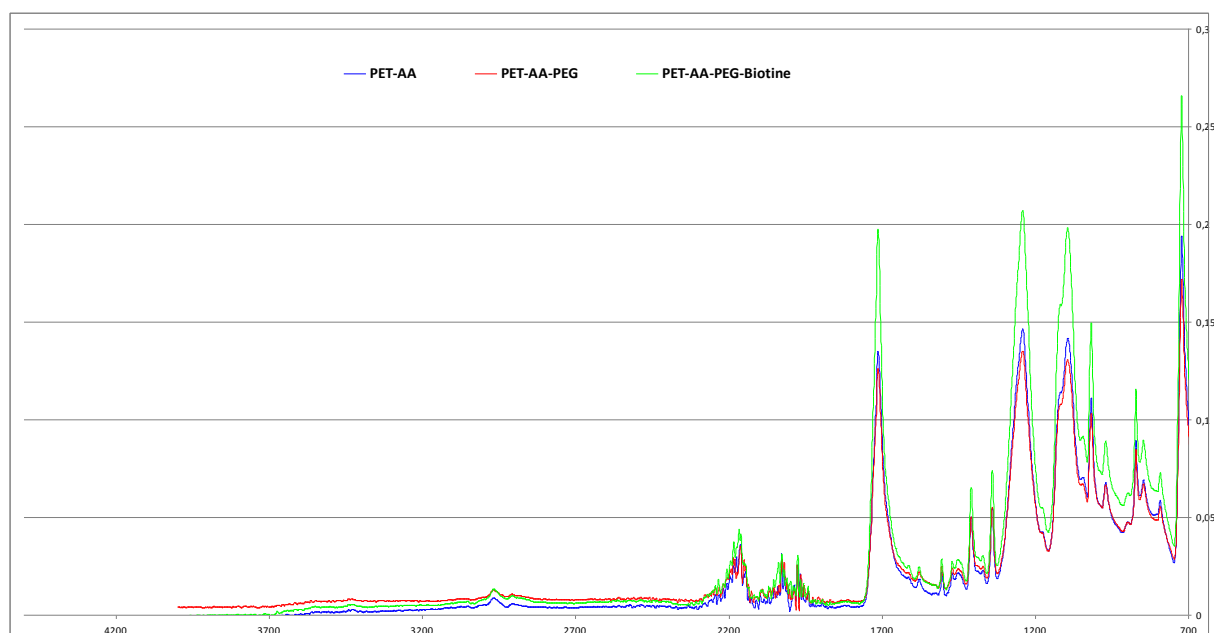


Figure 108 : Spectroscopie infrarouge de différents échantillons de PET obtenus lors des réactions de couplage du PET avec l'espaceur bNH2-PEG et le linker Biotine.

L'analyse infrarouge réalisée n'a pas permis de dépister des différences entre les différents échantillons après fixation de l'agent espaceur bNH₂-PEG et son couplage avec le groupe Biotine sur la surface du PET. Toutefois, pris dans leur ensemble, les résultats des trois expériences de caractérisation du couplage de l'agent espaceur bNH₂-PEG et de la Biotine avec les fonctions carboxyles à la surface du PET-AA avaient démontré l'effectivité des réactions chimiques mises en route. Ils avaient aussi confirmé la présence du couple biotine-HH-PEG-NH₂ à la surface du PET fonctionnalisé bien que l'analyse en spectroscopie infrarouge n'ait pas été concluante. L'étape de fixation proprement dite de la molécule thérapeutique EP224283 a été ensuite réalisée.

4.8.4.3.2 Fixation de la EP224283 par liaison Biotine—Avidine—Biotine

4.8.4.3.2.1 Caractérisation indirecte de la fixation par le temps de céphaline activée

Dans le but de déterminer la présence effective de la molécule EP224283 sur les échantillons de PET fonctionnalisés (PET-AA-Spacer-EP224283) un test de céphaline activée (TCA) fut réalisé sur du sang humain citraté incubé pendant 30' au contact des différents échantillons prothétiques. L'activité de la molécule EP224283 (qui est un puissant inhibiteur du facteur Xa) est bien explorée par ce test. Des échantillons de PET-AA-bNH₂-PEG-Biotine avaient été soumis au protocole d'immobilisation de la molécule EP224283 via une réaction homo—bi—fonctionnelle Biotine—Avidine—Biotine. Une solution de EP224283 déposée libre sur une membrane de PET et mise au contact du sang dans les conditions de l'expérience servait de témoin positif. La Figure 109 résume les résultats.

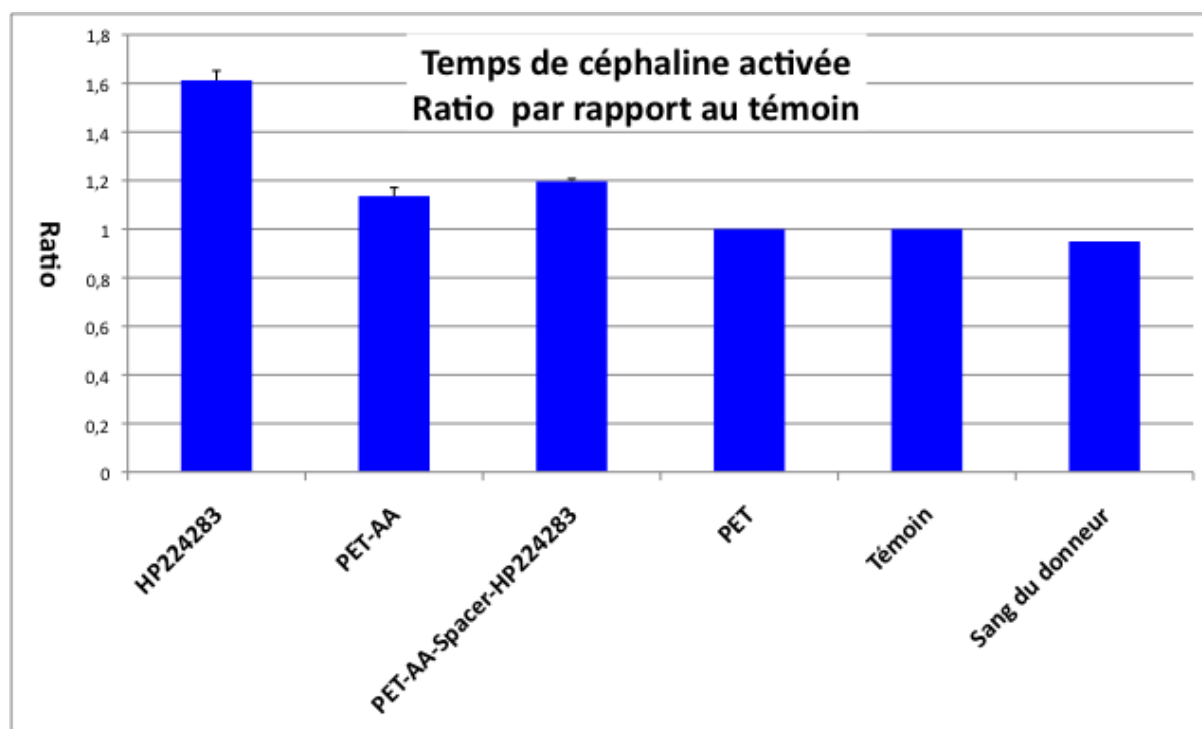


Figure 109 : Ratio du temps de céphaline activée obtenu sur différents échantillons de PET vierge ou modifié par rapport au témoin

Il y avait comme anticipé une élongation du temps de céphaline activée (TCA) avec le témoin positif aboutissant à un ratio de 1,6 fois le témoin. Le PET vierge n'avait aucun effet (ratio de TCA = 1). La présence du polymère d'acide polyacrylique à la surface du PET (PET-AA) allongeait légèrement le TCA aboutissant à un ratio moyen > 1 par rapport au témoin. Les échantillons fonctionnalisés de PET par immobilisation de la molécule EP224283 (PET-AA-Spacer-EP224283) provoquaient un allongement du TCA de 1,2 fois le témoin. Ce qui concorde avec la présence effective de la molécule EP224283 sur les échantillons fonctionnalisés de prothèse en PET (PET-AA-Spacer-EP224283).

4.8.4.3.2.2 Effets de la fixation de la molécule EP224283 sur la cinétique de coagulation

Les effets de la molécule EP224283 fixée sur des supports en PET lisse furent déterminés par une cinétique de coagulation. Des échantillons de PET (témoin négatif) et de la molécule EP224283 en solution déposée instantanément sur du PET lisse (témoin positif) ont été aussi évalués. La Figure 110 montre en unités arbitraires à travers le temps le taux d'hémoglobine libre pour chaque groupe d'échantillons. Ce taux reflétait l'intensité de l'anti coagulation au temps T.

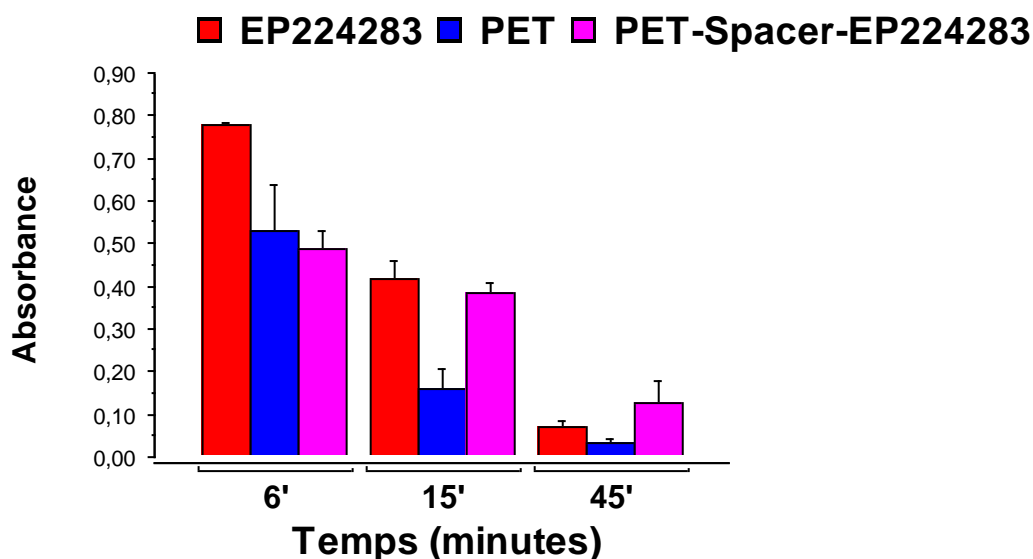


Figure 110 : Cinétique de coagulation (Unités arbitraires) au contact de divers échantillons

A 6 minutes l'activité anticoagulante de EP224283 (témoin positif) était maximale, se maintenait autour de 50% à 15 minutes pour tomber à 5% à 45 minutes. Comparés au PET les échantillons fonctionnalisés (PET-Spacer-EP224283) démontrèrent une activité nettement supérieure à 15 minutes et à 45 minutes reflétant la présence de la molécule anticoagulante greffée sur le support. Cette activité était même à 45 minutes supérieure à celle du témoin positif témoignant à travers le temps d'une activité persistante vraisemblablement liée à l'immobilisation de la molécule alors que sur le témoin positif où la molécule est libre cette activité avait considérablement diminué.

4.9 Discussion

L'obtention d'un matériel vasculaire synthétique totalement inerte a représenté, pendant longtemps, le Saint Graal des chercheurs en chirurgie cardiovasculaire. Toutefois, les avancées de la biologie ont permis de comprendre que l'interactivité entre les tissus vivants et les matériels exogènes implantés était incontournable. De nombreux efforts ont été déployés depuis, avec des fortunes diverses, pour améliorer la biocompatibilité des prothèses vasculaires. Au cours de cette étude, la fixation de la simvastatine sur un support prothétique visant à réduire la prolifération musculaire lisse n'a pas provoqué *in vitro* les effets escomptés. Nous avons en revanche trouvé une diminution significative de l'adhésion plaquettaire sur tous les échantillons greffés avec le polymère acrylique. De plus la fixation de l'héparine et de la molécule EP224283 avait permis d'obtenir une activité anticoagulante avec

les prothèses fonctionnalisées. Nous avons ainsi démontré que la fixation d'une molécule bio-active sur des supports prothétiques en PET en vue de leur conférer une activité spécifique était faisable. Bien que l'activité anticoagulante constatée tant avec l'héparine qu'avec la molécule EP224283 ait été pour le moment limitée, il est probable qu'elle s'amplifie avec l'optimisation du procédé d'immobilisation. Ces molécules sont dotées en effet d'un pouvoir anticoagulant connu pour être dose dépendant.

La molécule EP224283 tient en ce sens de bonnes promesses pour réduire la thrombogénicité des prothèses et des endoprothèses en PET. Hechler et al ont en effet rapporté des propriétés anti thrombotiques et anti agrégant plaquettaires de la molécule EP224283 tantôt supérieures tantôt équivalentes à celles de l'un ou l'autre des composés d'origine : Tirofiban ou Idraparinux (221). Ainsi dans un modèle de thromboembolie systémique indépendant de la formation de thrombine, EP224283 avait une efficacité similaire au tirofiban à des doses équimolaires. Dans des modèles dépendant de la thrombine, EP224283 était plus puissant que le Tirofiban ou l'Idraparinux pris séparément ou même pris en association. Des résultats identiques étaient trouvés in vivo sur la souris ApoE(-/-) (221). Au cours de ces travaux nous avons développé pour la première fois un système d'immobilisation de la molécule EP224283 à la surface du PET greffé à l'acide poly(acrylique) en ayant recours à un bras espaceur mettant à profit les interactions avidine biotine. A notre connaissance, un tel système de fonctionnalisation du PET pour la fabrication de prothèses vasculaires thromborésistantes n'existe pas encore. L'originalité de ces travaux tient en cela et au fait d'avoir adapté et combiné plusieurs technologies expérimentées ailleurs pour arriver à l'immobilisation spécifique de la molécule EP224283 à la surface du PET.

Au cours de cette étude, la majorité des effets recherchés sur les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les plaquettes semblent être obtenus avec le revêtement prothétique à l'AA. Le PTFE et le PET possèdent déjà beaucoup des propriétés de la prothèse vasculaire idéale mais restent des biomatériaux très hydrophobes. Le traitement plasma froid suivi de l'immobilisation de prostaglandines a été précédemment rapporté comme étant capable d'améliorer l'hydrophilie de ces supports (79). Au cours de cette étude, nous avons démontré qu'un revêtement du PET avec le PAA permettait d'augmenter encore l'hydrophilie obtenue avec le traitement plasma froid. De plus, nous avons trouvé que le greffage de l'AA sur le PET pouvait occasionner une réduction de l'adhésion plaquettaire. L'immobilisation pérenne de EP224283 combinant un anti-coagulant et un anti-agrégant plaquettaire pourrait aussi avoir des effets bénéfiques tant pour réduire les phénomènes d'hyperplasie myointimale à long terme que pour diminuer la thrombogénicité immédiate des implants vasculaires.

Dans l'étude en effet des mécanismes biologiques aboutissant aux occlusions et resténoses à moyen et à long terme par hyperplasie myointimale, un rôle prépondérant semble être joué par l'adhésion plaquettaire. En effet, l'implantation de matériel exogène provoque un état pro-inflammatoire (231), semblable à l'état d'activation endothéliale notée en cas d'agression de la paroi vasculaire (232). La plaquette sanguine semble être le premier élément cellulaire suivi des leucocytes à arriver en cas d'activation endothéliale. A ce compte, l'inhibition de l'adhésion plaquettaire a provoqué une réduction de l'infiltration leucocytaire et de l'athérosclérose chez un modèle murin d'hypercholestérolémie (232). Plusieurs études ont en effet évoqué le rôle primordial de l'adhésion plaquettaire non seulement dans la pathogenèse des thromboses précoces mais aussi comme point d'appel aux cellules inflammatoires dans les premières semaines suivant l'implantation d'une prothèse vasculaire (192). Cette réaction inflammatoire est en général souhaitée sur la face extra-luminale des prothèses car elle favorise leur incorporation tissulaire. À l'inverse, au niveau de la surface luminale des prothèses vasculaires où une interactivité sang-matériel exogène prend place, cette réaction inflammatoire a été trouvée délétère en stimulant la prolifération des myofibroblastes et des cellules musculaires lisses (231), déterminants de l'hyperplasie myointimale. A ce compte, le revêtement à l'AA des prothèses vasculaires suivi de l'immobilisation de la molécule EP224283 (antiGP-IIb-IIIa) pourrait permettre de réduire l'adhésion plaquettaire sur le PET. De plus amples investigations sont néanmoins nécessaires.

En ce qui a trait aux statines, bien qu'aucune activité biologique subséquente à la fixation de la molécule n'ait été démontrée dans les conditions de ces travaux, plusieurs aspects méritent d'être discutés. La dose de statine fixée sur le support peut être inférieure à la dose seuil requise pour induire des effets biologiques. En effet, nous avons déterminé de manière qualitative par ATG la présence de la simvastatine sur le PET sans pouvoir en apprécier la quantité. Le groupement lactone qui constitue le site actif des statines est fermé dans la simvastatine commerciale qui est un pro Drug. Dans l'organisme, ce groupement s'ouvre en une fonction acide pour donner lieu au métabolite actif de la simvastatine. Il est possible que cette réaction n'ait pas pu se produire *in vitro* dans les conditions expérimentales que nous avons définies. De même, nos résultats ne nous permettent pas d'exclure que le site actif de la simvastatine représenté par ce groupe lactone ait été malencontreusement le groupement réactionnel avec les COOH à la surface du PET-AA lors de la réaction de substitution avec l'EDAC. Une caractérisation physico-chimique plus poussée du PET fonctionnalisé serait nécessaire pour exclure une immobilisation de la simvastatine par son site actif.

Par ailleurs, les propriétés biologiques des statines ont été largement étudiées au cours de ces dernières années. Il existe actuellement peu de données précises sur les mécanismes de ses effets dits pléiotropes à l'échelle moléculaire. Notamment, la localisation membranaire, cytosolique ou nucléaire de son ou de ses sites d'action n'est pas connue. Il a été suggéré que l'inhibition de la synthèse des isoprénoides comme le geranyl-geranyl-pyrophosphate (GGPP) et le farnesyl-pyrophosphate (FPP) soit responsable d'une action sur les protéines de liaison Ras et Rho du GTP (233) ou encore sur la caspase-1 (234). Rho semble en effet réguler l'expression du gène de l'eNOs et contrôler la prolifération des cellules musculaires lisses (235). De même, il existe des arguments suggérant que la simvastatine inhibe la liaison de NF-kappaB et de la protéine AP-1 aux protéines nucléaires des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales (236). Plus récemment, une régulation à la hausse du facteur transcriptionnel "athérome protecteur" Kruppel-like-factor 2 a été observée au niveau des cellules endothéliales et au niveau des monocytes macrophages sous l'effet des statines (237, 238). Cependant, la question d'une translocation cytosolique première de la simvastatine pour qu'elle atteigne son site de reconnaissance reste encore non résolue. Ce qui pourrait constituer dans notre cas la principale cause de l'inactivité biologique de la simvastatine fixée sur les supports en PET.

4.10 Conclusion

Au cours de ces travaux, nous avons démontré la faisabilité d'une fixation covalente d'une molécule bioactive sur des prothèses vasculaires en PET. Une réaction de copolymérisation greffante à l'acide acrylique après traitement plasma froid préalable permet de revêtir le PET de nombreuses fonctions carboxyles utilisables pour la fixation de biomolécules diverses. Les conditions optimales du greffage à la surface de ces prothèses ont été aussi déterminées. De plus, nos résultats montrent que le rajout des fonctions carboxyles ne modifiait ni la cytocompatibilité ni l'hémocompatibilité de ces prothèses. Une diminution de la capacité des plaquettes sanguines à s'adhérer ainsi qu'un ralentissement de leur cinétique d'agrégation sur les prothèses greffées avec l'acide acrylique à 2.5M ont même été observées. Ce qui pourrait annoncer des propriétés intéressantes pour réduire la thrombogénicité des substituts vasculaires en PET. Ces travaux nous ont permis aussi d'implémenter un procédé nouveau pour l'immobilisation à la surface du PET d'une molécule nouvelle douée de propriétés anticoagulantes et antiagrégants plaquettaires, lesquelles propriétés peuvent s'avérer positives

par rapport aux objectifs poursuivis. De nouvelles pistes de recherche s'ouvrent pour mieux caractériser et optimiser la fixation des molécules bioactives. Les agents biologiques ou pharmaceutiques potentiellement utilisables sont multiples (certains médicaments, peptides de faible poids moléculaire, séquences d'acides nucléiques, vecteurs viraux, etc.). L'efficacité du concept devra être vérifiée au moyen de modèles biologiques *in vitro* et *in vivo*.

5 Conclusion générale et perspectives

Les prothèses vasculaires à libération prolongée de principes actifs constituent une évolution naturelle des recherches dans le domaine des biomatériaux appliqués à la chirurgie vasculaire. Au cours de ces expériences nous avons démontré qu'une modification des prothèses vasculaires en PET par l'adjonction d'un poly-CTR-HP β CD permettrait de libérer des antibiotiques isolés ou en association. Nos données expérimentales laissent présager une grande versatilité thérapeutique en fonction des situations cliniques. Les infections de prothèse vasculaire dues à des bactéries gram négatif, non couvertes actuellement par le spectre des prothèses imprégnées disponibles, pourraient ainsi être adressées de manière efficace. Nos résultats ont aussi démontré l'innocuité et la biocompatibilité des prothèses vasculaires fonctionnalisées par le poly-CTR-HP β CD. Le concept développé pourrait également s'adapter à d'autres types de biomatériaux et à d'autres molécules bioactives, notamment il pourrait convenir aux antifongiques. Ces dernières molécules ont un intérêt grandissant dans la prise en charge des malades qui ont des infections polymicrobiennes incluant des champignons notamment quand la contamination de la prothèse est d'origine digestive. La transposition des résultats obtenus *in vitro* ou chez l'animal n'est pas toujours réalisable ou valide chez l'humain. Les résultats favorables que nous avons obtenus devront être investigués plus amplement en clinique. De manière plus spécifique, le sang circulant doit certainement interférer dans les interactions hôte prothèse. Un modèle de contamination bactérienne impliquant une prothèse en position fonctionnelle avec un flux sanguin circulant pourrait être aussi judicieux pour tenir compte de l'ensemble des interactions et se rapprocher encore davantage de la situation clinique chez l'homme. L'utilisation prophylactique de prothèses fonctionnalisées aux antibiotiques pourrait aussi s'avérer controversée. La plupart des infections de prothèses vasculaires surviennent toutefois à la suite d'une contamination périopératoire du matériel implanté. Le début des manifestations cliniques peut être instantané (<1 mois), précoce (<4 mois) ou tardif (>4 mois) dépendamment si le germe en cause est extrêmement virulent, virulent ou relativement indolent. Souvent les bactéries présentes à l'implantation de la prothèse restent quiescentes des mois voire des années avant de devenir manifestes sous la forme d'une infection cliniquement évidente. Tout semble indiquer que si la prothèse implantée disposait d'une compétence ou d'un pouvoir bactéricide ou bactériostatique suffisant pour empêcher l'adhésion, la prolifération ou la constitution d'un biofilm par les bactéries on pourrait réduire l'incidence des infections d'implants médicaux en général. Toutefois les implications de santé publique sont telles, en particulier par rapport à

l'émergence de germes mutants résistants, que de plus amples investigations notamment cliniques sont nécessaires en vue d'apprécier l'intérêt d'une antibioprophylaxie locale modulable et adaptable selon l'environnement d'implantation de la prothèse.

L'obtention d'un matériel prothétique peu thrombogène est l'un des buts ardemment poursuivis depuis quelques années en vue de fabriquer des substituts vasculaires pour les artères de moins de 6 mm de diamètre. Cette limite est actuellement infranchissable tant dans la conception des prothèses vasculaires conventionnelles que dans celle des stents couverts. Le concept de la fonctionnalisation des prothèses vasculaires par un polymère d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine souffre de limitations théoriques potentielles quand il faut s'attaquer à la thrombogénicité immédiate ou tardive de ces prothèses. Nous avons expérimenté un concept alternatif d'immobilisation de principes actifs d'intérêt à la surface du PET. La simvastatine n'a pas démontré de résultats concluants pour la poursuite du but recherché. Les critères d'évaluation que nous avons retenus portant sur la prolifération in vitro des cellules HPMECs pourraient aussi être inadéquats. Il est possible que les effets des statines sur la prolifération musculaire lisse ou sur l'adhésion plaquettaire passent par un meilleur fonctionnement des cellules endothéliales. Une part importante de l'activité locale des statines passe en effet par l'augmentation de la production de NO par les cellules endothéliales. De plus, les propriétés anti-inflammatoires du PET fonctionnalisé mériteraient d'être évaluées non seulement à cause des effets anti-inflammatoires des statines mais aussi en raison du rôle de l'inflammation initiale dans le développement de l'hyperplasie myointimale.

Le concept de fonctionnalisation des prothèses vasculaires par immobilisation de principes actifs n'est pas nouveau mais restera d'un grand intérêt. En démontrant pour la première fois la faisabilité de la fixation de la simvastatine et particulièrement de la molécule EP224283 via un bras espaceur contenant du PEG, de la biotine et de l'avidine, la voie s'ouvre peut-être pour la fixation sur le PET ou sur le ePTFE d'autres biomolécules pouvant conserver une activité après leur fixation ou servir de point d'ancrage aux cellules progénitrices endothéliales.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Voorhees AB, Jr., Jaretzki A, 3rd, Blakemore AH. The use of tubes constructed from vinyon "N" cloth in bridging arterial defects. *Ann Surg.* 1952 Mar;135(3):332-6.
2. Jean-Baptiste E, Haulon S, Blanchemain N. Development of bioactive vascular devices. In: Branchereau A, Jacobs M, editors. *Innovative Cardiovascular Procedures.* Turin: Edizioni Minerva Medica; 2009. p. 103-8.
3. Popkin BM, Gordon-Larsen P. The nutrition transition: worldwide obesity dynamics and their determinants. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2004 Nov;28 Suppl 3:S2-9.
4. Jordan SW, Haller CA, Sallach RE, Apkarian RP, Hanson SR, Chaikof EL. The effect of a recombinant elastin-mimetic coating of an ePTFE prosthesis on acute thrombogenicity in a baboon arteriovenous shunt. *Biomaterials.* 2007;28(17087991):1191-7.
5. Jean-Baptiste E, Blanchemain N, Neut C, Martel B, Hildebrand HF, Haulon S. Les prothèses vasculaires enrobées de cyclodextrines: Une alternative prometteuse dans le traitement des infections de prothèses vasculaires. In: Goeau-Brissonniere O, Ricco JB, Kieffer E, editors. *Infections artérielles en 2009.* Neuilly-su-Seine: Global média santé; 2009. p. 132-8.
6. Chakfe N, Dieval F, Thaveau F, Rinckenbach S, Hassani O, Camelot G, et al. [Vascular graft prosthesis]. *Ann Chir.* 2004;129(15220107):301-9.
7. Kanki-Horimoto S, Horimoto H, Mieno S, Kishida K, Watanabe F, Furuya E, et al. Synthetic vascular prosthesis impregnated with mesenchymal stem cells overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2006;114(16820594):327-30.
8. Kapadia MR, Popowich DA, Kibbe MR. Modified prosthetic vascular conduits. *Circulation.* 2008;117(18391121):1873-82.
9. Bavry AA, Kumbhani DJ, Helton TJ, Borek PP, Mood GR, Bhatt DL. Late thrombosis of drug-eluting stents: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Am J Med.* 2006;119(17145250):1056-61.
10. Bergqvist D, Bjorck M, Nyman R. Secondary aortoenteric fistula after endovascular aortic interventions: a systematic literature review. *J Vasc Interv Radiol.* 2008;19(18341942):163-5.
11. Copeland GP, Edwards P, Wilcox A, Wake PN, Harris PL. GORA: a scoring system for the quantification of risk of graft occlusion. *Ann R Coll Surg Engl.* 1994;76(8154808):132-5.
12. Guidoin R, Chakfe N, Maurel S, How T, Batt M, Marois M, et al. Expanded polytetrafluoroethylene arterial prostheses in humans: histopathological study of 298 surgically excised grafts. *Biomaterials.* 1993 Jul;14(9):678-93.
13. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362(8479518):801-9.
14. Seeger JM. Management of patients with prosthetic vascular graft infection. *Am Surg.* 2000;66(10695748):166-77.
15. Williams GM. Complications of vascular surgery. *Surg Clin North Am.* 1993;73(8456360):323-35.
16. Jordan SW, Chaikof EL. Novel thromboresistant materials. *J Vasc Surg.* 2007;45 Suppl A(17544031):104-15.
17. Parodi JC, Palmaz JC, Barone HD. Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg.* 1991 Nov;5(6):491-9.

18. Amiot S, Haulon S, Becquemin JP, Magnan PE, Lermusiaux P, Goueffic Y, et al. Fenestrated endovascular grafting: the French multicentre experience. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2010 May;39(5):537-44.
19. Haulon S, D'Elia P, O'Brien N, Sobocinski J, Perrot C, Lerussi G, et al. Endovascular repair of thoracoabdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2010 Feb;39(2):171-8.
20. van der Bas JM, Quax PH, van den Berg AC, Visser MJ, van der Linden E, van Bockel JH. Ingrowth of aorta wall into stent grafts impregnated with basic fibroblast growth factor: a porcine in vivo study of blood vessel prosthesis healing. *J Vasc Surg.* 2004 Apr;39(4):850-8.
21. Kusanagi M, Matsui O, Sanada J, Ogi T, Takamatsu S, Zhong H, et al. Hydrogel-mediated release of basic fibroblast growth factor from a stent-graft accelerates biological fixation with the aortic wall in a porcine model. *J Endovasc Ther.* 2007 Dec;14(6):785-93.
22. Kajimoto M, Shimono T, Hirano K, Miyake Y, Kato N, Imanaka-Yoshida K, et al. Basic fibroblast growth factor slow release stent graft for endovascular aortic aneurysm repair: a canine model experiment. *J Vasc Surg.* 2008 Nov;48(5):1306-14.
23. Martel B, Blanchemain N, Morcellet M, Hildebrand HF, Haulon S, Boschini F, et al., inventors; Biomateriaux porteurs de cyclodextrines aux propriétés d'absorption améliorées et de libération progressive et retardée de molécules thérapeutiques. 2005b.
24. Blanchemain N, Haulon S, Martel B, Traisnel M, Morcellet M, Hildebrand HF. Vascular PET prostheses surface modification with cyclodextrin coating: development of a new drug delivery system. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005 Jun;29(6):628-32.
25. Blanchemain N, Haulon S, Boschini F, Traisnel M, Morcellet M, Martel B, et al. Vascular prostheses with controlled release of antibiotics Part 2. In vitro biological evaluation of vascular prostheses treated by cyclodextrins. *Biomol Eng.* 2007 Feb;24(1):143-8.
26. Martel B, Morcellet M, Ruffin D, Ducoroy L, Weltrowski M. Finishing of polyester fabrics by cyclodextrins by using polycarboxylic acids as crosslinking agents. *J Incl Phen Macromol Chem.* 2002;44:443-6.
27. Martel B, Ruffin D, Morcellet M, Weltrowski M, Lekchiri Y. Water soluble polymers and gels from polycondensation between cyclodextrins and polycarboxylic acids : study of the preparation parameters. *J Appl Polym Sci.* 2005;97:433-42.
28. Carrel A. Les anastomoses vasculaires et la transplantation des viscères. *Lyon Méd.* 1902;98.
29. Carrel A. Les anastomoses vasculaires et leur technique opératoire. *Union Médicale du Canada.* 1904;33:521-7.
30. Oudot J. [Vascular grafting in thromboses of the aortic bifurcation]. *Presse Med.* 1951 Feb 21;59(12):234-6.
31. De Bakey ME, Crawford ES, Cooley DA, Morris GC. Surgical considerations of occlusive disease of the abdominal aorta and iliac and femoral arteries; analysis of 803 cases. *Ann Surg.* 1958;148(13571910):306-24.
32. Veith FJ, Gupta SK, Ascer E, White-Flores S, Samson RH, Scher LA, et al. Six-year prospective multicenter randomized comparison of autologous saphenous vein and expanded polytetrafluoroethylene grafts in infrainguinal arterial reconstructions. *J Vasc Surg.* 1986 Jan;3(1):104-14.
33. Jean-Baptiste E, Hassen-Khodja R, Bouillanne PJ, Haudebourg P, Declémy S, Batt M. Endovascular repair of infrarenal abdominal aortic aneurysms in high-risk-surgical patients. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007 Aug;34(2):145-51.

34. Wesolowski SA, Fries CC, Karlson KE, De Bakey M, Sawyer PN. Porosity: primary determinant of ultimate fate of synthetic vascular grafts. *Surgery*. 1961 Jul;50:91-6.
35. Yates SG, Barros D'Sa AA, Berger K, Fernandez LG, Wood SJ, Rittenhouse EA, et al. The preclotting of porous arterial prostheses. *Ann Surg*. 1978 Nov;188(5):611-22.
36. Jean-Baptiste E, Blanchemain N, Martel B, Neut C, Hildebrand HF, Haulon S. Safety, healing, and efficacy of vascular prostheses coated with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin polymer: experimental in vitro and animal studies. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2012 Feb;43(2):188-97.
37. Naylor AR, Clark S, London NJ, Sayers RD, Macpherson DS, Barrie WW. Treatment of major aortic graft infection: preliminary experience with total graft excision and in situ replacement with a rifampicin bonded prosthesis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1995 Feb;9(2):252-6.
38. Goeau-Brissonniere O, Leport C, Bacourt F, Lebrault C, Comte R, Pechere JC. Prevention of vascular graft infection by rifampin bonding to a gelatin-sealed Dacron graft. *Ann Vasc Surg*. 1991 Sep;5(5):408-12.
39. Goeau-Brissonniere O, Leport C, Lebrault C, Renier FJ, Bacourt F, Vilde JL, et al. Antibiotic prophylaxis of late bacteremic vascular graft infection in a dog model. *Ann Vasc Surg*. 1990 Nov;4(6):528-32.
40. Hernandez-Richter T, Schardey HM, Wittmann F, Mayr S, Schmitt-Sody M, Blasenbren S, et al. Rifampin and Triclosan but not silver is effective in preventing bacterial infection of vascular dacron graft material. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2003 Nov;26(5):550-7.
41. Ricco JB, Assadian A, Schneider F, Assadian O. In vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of a new silver-triclosan vs a silver collagen-coated polyester vascular graft against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Vasc Surg*. 2012 Mar;55(3):823-9.
42. Machy D, Siali R, Jozefonvicz J. Impregnated Vascular Prostheses: synthetic matrices. In: Chakfé N, Durand B, Kretz J, editors. *New Technologies in Vascular Biomaterials*. Strasbourg: Europrot; 2003. p. 67-80.
43. Tran HS, Puc MM, Hewitt CW, Soll DB, Marra SW, Simonetti VA, et al. Diamond-like carbon coating and plasma or glow discharge treatment of mechanical heart valves. *J Invest Surg*. 1999 May-Jun;12(3):133-40.
44. Frost MC, Reynolds MM, Meyerhoff ME. Polymers incorporating nitric oxide releasing/generating substances for improved biocompatibility of blood-contacting medical devices. *Biomaterials*. 2005 May;26(14):1685-93.
45. Dutton RC, Webber AJ, Johnson SA, Baier RE. Microstructure of initial thrombus formation on foreign materials. *J Biomed Mater Res*. 1969 Mar;3(1):13-23.
46. Yang Y, Franzen SF, Olin CL. In vivo comparison of hemocompatibility of materials used in mechanical heart valves. *J Heart Valve Dis*. 1996 Sep;5(5):532-7.
47. Yamada KM, Olden K. Fibronectins--adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature*. 1978 Sep 21;275(5677):179-84.
48. Gluszko P, Rucinski B, Musial J, Wenger RK, Schmaier AH, Colman RW, et al. Fibrinogen receptors in platelet adhesion to surfaces of extracorporeal circuit. *Am J Physiol*. 1987 Mar;252(3 Pt 2):H615-21.
49. O'Brien T, Collin J. Prosthetic vascular graft infection. *Br J Surg*. 1992 Dec;79(12):1262-7.
50. Hennes N, Sandmann W, Torsello G, Kniemeyer HW, Grabitz K. [Infection of a vascular prosthesis--a retrospective analysis of 99 cases]. *Chirurg*. 1996 Jan;67(1):37-43.

51. Young RM, Cherry KJ, Jr., Davis PM, Gloviczki P, Bower TC, Panneton JM, et al. The results of in situ prosthetic replacement for infected aortic grafts. *Am J Surg.* 1999 Aug;178(2):136-40.
52. Bandyk DF. Vascular surgical site infection: risk factors and preventive measures. *Semin Vasc Surg.* 2008 Sep;21(3):119-23.
53. Santini C, Baiocchi P, Venditti M, Brandimarte C, Tarasi A, Rizzo L, et al. Aorto-femoral graft infections: a clinical and microbiological analysis. *J Infect.* 1993 Jul;27(1):17-26.
54. Batt M, Jean-Baptiste E, O'Connor S, Bouillanne PJ, Haudebourg P, Hassen-Khodja R, et al. In-situ revascularisation for patients with aortic graft infection: a single centre experience with silver coated polyester grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2008 Aug;36(2):182-8.
55. Jean-Baptiste E, Batt M, Brizzy S, Mousnier A, Declémy S, Hassen-Khodja R. Dealing with vascular graft infection, including aortic enteric fistulas. In: Jacobs M, editor. *Prevention and management of vascular complications.* Milan 2011. p. 81-96.
56. O'Connor S, Andrew P, Batt M, Becquemin JP. A systematic review and meta-analysis of treatments for aortic graft infection. *J Vasc Surg.* 2006 Jul;44(1):38-45.
57. Oderich GS, Bower TC, Cherry KJ, Jr., Panneton JM, Sullivan TM, Noel AA, et al. Evolution from axillofemoral to in situ prosthetic reconstruction for the treatment of aortic graft infections at a single center. *J Vasc Surg.* 2006 Jun;43(6):1166-74.
58. Clagett GP, Bowers BL, Lopez-Viejo MA, Rossi MB, Valentine RJ, Myers SI, et al. Creation of a neo-aortoiliac system from lower extremity deep and superficial veins. *Ann Surg.* 1993 Sep;218(3):239-48; discussion 48-9.
59. Clagett GP, Valentine RJ, Hagino RT. Autogenous aortoiliac/femoral reconstruction from superficial femoral-popliteal veins: feasibility and durability. *J Vasc Surg.* 1997 Feb;25(2):255-66; discussion 67-70.
60. Nevelsteen A, Lacroix H, Suy R. Infrarenal aortic graft infection: in situ aortoiliofemoral reconstruction with the lower extremity deep veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1997 Dec;14 Suppl A:88-92.
61. Wells JK, Hagino RT, Bargmann KM, Jackson MR, Valentine RJ, Kakish HB, et al. Venous morbidity after superficial femoral-popliteal vein harvest. *J Vasc Surg.* 1999 Feb;29(2):282-89; discussion 9-91.
62. Modrall JG, Sadjadi J, Ali AT, Anthony T, Welborn MB, 3rd, Valentine RJ, et al. Deep vein harvest: predicting need for fasciotomy. *J Vasc Surg.* 2004 Feb;39(2):387-94.
63. Modrall JG, Hocking JA, Timaran CH, Rosero EB, Arko FR, 3rd, Valentine RJ, et al. Late incidence of chronic venous insufficiency after deep vein harvest. *J Vasc Surg.* 2007 Sep;46(3):520-5; discussion 5.
64. Smith ST, Clagett GP. Femoral vein harvest for vascular reconstructions: pitfalls and tips for success. *Semin Vasc Surg.* 2008 Mar;21(1):35-40.
65. O'Hara PJ, Hertzner NR, Beven EG, Krajewski LP. Surgical management of infected abdominal aortic grafts: review of a 25-year experience. *J Vasc Surg.* 1986 May;3(5):725-31.
66. Kieffer E, Gomes D, Chiche L, Fleron MH, Koskas F, Bahnini A. Allograft replacement for infrarenal aortic graft infection: early and late results in 179 patients. *J Vasc Surg.* 2004 May;39(5):1009-17.
67. Gahtan V, Esses GE, Bandyk DF, Nelson RT, Dupont E, Mills JL. Antistaphylococcal activity of rifampin-bonded gelatin-impregnated Dacron grafts. *J Surg Res.* 1995 Jan;58(1):105-10.

68. Coggia M, Goeau-Brissonniere O, Leflon V, Nicolas MH, Pechere JC. Experimental treatment of vascular graft infection due to *Staphylococcus epidermidis* by in situ replacement with a rifampin-bonded polyester graft. *Ann Vasc Surg*. 2001 Jul;15(4):421-9.
69. Goeau-Brissonniere OA, Fabre D, Leflon-Guibout V, Di Centa I, Nicolas-Chanoine MH, Coggia M. Comparison of the resistance to infection of rifampin-bonded gelatin-sealed and silver/collagen-coated polyester prostheses. *J Vasc Surg*. 2002 Jun;35(6):1260-3.
70. Javerliat I, Goeau-Brissonniere O, Sivadon-Tardy V, Coggia M, Gaillard JL. Prevention of *Staphylococcus aureus* graft infection by a new gelatin-sealed vascular graft prebonded with antibiotics. *J Vasc Surg*. 2007 Nov;46(5):1026-31.
71. Bandyk DF, Novotney ML, Back MR, Johnson BL, Schmacht DC. Expanded application of in situ replacement for prosthetic graft infection. *J Vasc Surg*. 2001 Sep;34(3):411-9; discussion 9-20.
72. Abbott WM, Megerman J, Hasson JE, L'Italien G, Warnock DF. Effect of compliance mismatch on vascular graft patency. *J Vasc Surg*. 1987;5(3102762):376-82.
73. Serruys PW, Kutryk MJ, Ong AT. Coronary-artery stents. *N Engl J Med*. 2006 Feb 2;354(5):483-95.
74. Komatsu R, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Becker AE. Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses. *Circulation*. 1998 Jul 21;98(3):224-33.
75. Kibbe M, Billiar T, Tzeng E. Inducible nitric oxide synthase and vascular injury. *Cardiovasc Res*. 1999;43(10690336):650-7.
76. Reynolds MM, Hrabie JA, Oh BK, Politis JK, Citro ML, Keefer LK, et al. Nitric oxide releasing polyurethanes with covalently linked diazeniumdiolated secondary amines. *Biomacromolecules*. 2006;7(16529441):987-94.
77. Jun H-W, Taite LJ, West JL. Nitric oxide-producing polyurethanes. *Biomacromolecules*. 2005;6(15762649):838-44.
78. Kapfer X, Meichelboeck W, Groegler FM. Comparison of carbon-impregnated and standard ePTFE prostheses in extra-anatomical anterior tibial artery bypass: a prospective randomized multicenter study. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2006;32(16617028):155-68.
79. Chinn JA, Sauter JA, Phillips RE, Jr., Kao WJ, Anderson JM, Hanson SR, et al. Blood and tissue compatibility of modified polyester: thrombosis, inflammation, and healing. *J Biomed Mater Res*. 1998 Jan;39(1):130-40.
80. Rhee RY, Gloviczki P, Cambria RA, Miller VM. Experimental evaluation of bleeding complications, thrombogenicity and neointimal characteristics of prosthetic patch materials used for carotid angioplasty. *Cardiovasc Surg*. 1996 Dec;4(6):746-52.
81. Meerwaldt R, Lansink KW, Blomme AM, Fritschy WM. Prospective randomized study of carotid endarterectomy with Fluoropassiv thin wall carotid patch versus venous patch. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2008 Jul;36(1):45-52.
82. Karrer L, Duwe J, Zisch AH, Khabiri E, Cikirikcioglu M, Napoli A, et al. PPS-PEG surface coating to reduce thrombogenicity of small diameter ePTFE vascular grafts. *Int J Artif Organs*. 2005;28(16288437):993-991002.
83. Jordan SW, Faucher KM, Caves JM, Apkarian RP, Rele SS, Sun X-L, et al. Fabrication of a phospholipid membrane-mimetic film on the luminal surface of an ePTFE vascular graft. *Biomaterials*. 2006;27(16516285):3473-81.

84. Yoneyama T, Sugihara K-i, Ishihara K, Iwasaki Y, Nakabayashi N. The vascular prosthesis without pseudointima prepared by antithrombogenic phospholipid polymer. *Biomaterials*. 2002;23(11829441):1455-9.
85. Chen C, Ofenloch JC, Yianni YP, Hanson SR, Lumsden AB. Phosphorylcholine coating of ePTFE reduces platelet deposition and neointimal hyperplasia in arteriovenous grafts. *J Surg Res*. 1998;77(9733597):119-25.
86. Galli M, Bartorelli A, Bedogni F, DeCesare N, Klugmann S, Maiello L, et al. Italian BiodivYsio open registry (BiodivYsio PC-coated stent): study of clinical outcomes of the implant of a PC-coated coronary stent. *J Invasive Cardiol*. 2000;12(10973369):452-8.
87. Yang J, Webb AR, Pickerill SJ, Hageman G, Ameer GA. Synthesis and evaluation of poly(diols citrate) biodegradable elastomers. *Biomaterials*. 2006;27(16290904):1889-98.
88. Park K, Mosher DF, Cooper SL. Acute surface-induced thrombosis in the canine ex vivo model: importance of protein composition of the initial monolayer and platelet activation. *J Biomed Mater Res*. 1986;20(3711136):589-612.
89. Kottke-Marchant K, Anderson JM, Umemura Y, Marchant RE. Effect of albumin coating on the in vitro blood compatibility of Dacron arterial prostheses. *Biomaterials*. 1989;10(2524222):147-55.
90. Ito S, Ishimaru S, Wilson SE. Effect of coacervated alpha-elastin on proliferation of vascular smooth muscle and endothelial cells. *Angiology*. 1998;49(9555932):289-97.
91. Li C, Hill A, Imran M. In vitro and in vivo studies of ePTFE vascular grafts treated with P15 peptide. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2005;16(16128294):875-91.
92. Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, Ong ATL, McFadden EP, Sianos G, et al. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(15893169):1574-9.
93. Rotmans JI, Heyligers JMM, Verhagen HJM, Velema E, Nagtegaal MM, de Kleijn DPV, et al. In vivo cell seeding with anti-CD34 antibodies successfully accelerates endothelialization but stimulates intimal hyperplasia in porcine arteriovenous expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Circulation*. 2005;112(15983250):12-8.
94. Blindt R, Vogt F, Astafieva I, Fach C, Hristov M, Krott N, et al. A novel drug-eluting stent coated with an integrin-binding cyclic Arg-Gly-Asp peptide inhibits neointimal hyperplasia by recruiting endothelial progenitor cells. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(16682302):1786-95.
95. Greisler HP, Cziperle DJ, Kim DU, Garfield JD, Petsikas D, Murchan PM, et al. Enhanced endothelialization of expanded polytetrafluoroethylene grafts by fibroblast growth factor type 1 pretreatment. *Surgery*. 1992;112(1641764):244-54.
96. Deutsch M, Meinhart J, Fischlein T, Preiss P, Zilla P. Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience. *Surgery*. 1999;126(10568184):847-55.
97. Laube HR, Duwe J, Rutsch W, Konertz W. Clinical experience with autologous endothelial cell-seeded polytetrafluoroethylene coronary artery bypass grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000;120(10884666):134-41.
98. Magometschnigg H, Kadletz M, Vodrazka M, Dock W, Grimm M, Grabenwoger M, et al. Prospective clinical study with in vitro endothelial cell lining of expanded polytetrafluoroethylene grafts in crural repeat reconstruction. *J Vasc Surg*. 1992;15(1538510):527-35.
99. Fujita Y, Wu MH, Ishida A, Shi Q, Walker M, Hammond WP, et al. Accelerated healing of Dacron grafts seeded by preclotting with autologous bone marrow blood. *Ann Vasc Surg*. 1999;13(10398737):402-12.

100. Zhang J, Qi H, Wang H, Hu P, Ou L, Guo S, et al. Engineering of vascular grafts with genetically modified bone marrow mesenchymal stem cells on poly (propylene carbonate) graft. *Artif Organs*. 2006;30(17181830):898-905.
101. Hashi CK, Zhu Y, Yang G-Y, Young WL, Hsiao BS, Wang K, et al. Antithrombogenic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(17615237):11915-20.
102. Keuren JFW, Wienders SJH, Driessen A, Verhoeven M, Hendriks M, Lindhout T. Covalently-Bound Heparin Makes Collagen Thromboresistant. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004;24(3 %U <http://atvb.ahajournals.org/content/24/3/613.abstract>):613-7.
103. Luong-Van E, Grv[]ndahl L, Chua KN, Leong KW, Nurcombe V, Cool SM. Controlled release of heparin from poly(ε-caprolactone) electrospun fibers. *Biomaterials*. [doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.10.028]. 2006;27(9):2042-50.
104. Elgue G, Sanchez J, Egberg N, Olsson P, Riesenfeld J. Effect of surface-immobilized heparin on the activation of adsorbed factor XII. *Artif Organs*. 1993 Aug;17(8):721-6.
105. Sanchez J Fau - Elgue G, Elgue G Fau - Riesenfeld J, Riesenfeld J Fau - Olsson P, Olsson P. Control of contact activation on end-point immobilized heparin: the role of antithrombin and the specific antithrombin-binding sequence. 19950831 DCOM-19950831(0021-9304 (Print)).
106. Sanchez J, Elgue G, Riesenfeld J, Olsson P. Studies of Adsorption, Activation, and Inhibition of Factor XII on Immobilized Heparin. *Thrombosis Research*. [doi: 10.1016/S0049-3848(97)00310-1]. 1998;89(1):41-50.
107. Bosiers M, Deloose K, Verbist J, Schroe H, Lauwers G, Lansink W, et al. Heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene vascular graft for femoropopliteal and femorocrural bypass grafting: 1-year results. *J Vasc Surg*. 2006;43(16476607):313-8.
108. Lindholt JS, Gottschalksen B, Johannesen N, Dueholm D, Ravn H, Christensen ED, et al. The Scandinavian Propaten((R)) trial - 1-year patency of PTFE vascular prostheses with heparin-bonded luminal surfaces compared to ordinary pure PTFE vascular prostheses - a randomised clinical controlled multi-centre trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2011 May;41(5):668-73.
109. Tseng P-Y, Rele SS, Sun X-L, Chaikof EL. Membrane-mimetic films containing thrombomodulin and heparin inhibit tissue factor-induced thrombin generation in a flow model. *Biomaterials*. 2006;27(16376423):2637-50.
110. Wyers MC, Phaneuf MD, Rzucidlo EM, Contreras MA, LoGerfo FW, Quist WC. In vivo assessment of a novel dacron surface with covalently bound recombinant hirudin. *Cardiovasc Pathol*. 1999;8(10722238):153-9.
111. Phaneuf MD, Dempsey DJ, Bide MJ, Szycher M, Quist WC, LoGerfo FW. Bioengineering of a novel small diameter polyurethane vascular graft with covalently bound recombinant hirudin. *ASAIO J*. 1998 Sep-Oct;44(5):M653-8.
112. Greco RS, Kim HC, Donetz AP, Harvey RA. Patency of a small vessel prosthesis bonded to tissue plasminogen activator and iloprost. *Ann Vasc Surg*. 1995;9(7540408):140-5.
113. Heise M, Schmidmaier G, Husmann I, Heidenhain C, Schmidt J, Neuhaus P, et al. PEG-hirudin/iloprost coating of small diameter ePTFE grafts effectively prevents pseudointima and intimal hyperplasia development. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2006;32(16682237):418-24.
114. Aldenhoff YBJ, Koole LH. Platelet adhesion studies on dipyridamole coated polyurethane surfaces. *Eur Cell Mater*. 2003;5(14562273):61-7.

115. Cagiannos C, Abul-Khoudoud OR, DeRijk W, Shell DH, Jennings LK, Tolley EA, et al. Rapamycin-coated expanded polytetrafluoroethylene bypass grafts exhibit decreased anastomotic neointimal hyperplasia in a porcine model. *J Vasc Surg*. 2005;42(16275457):980-8.
116. Lee BH, Nam HY, Kwon T, Kim SJ, Kwon GY, Jeon HJ, et al. Paclitaxel-coated expanded polytetrafluoroethylene haemodialysis grafts inhibit neointimal hyperplasia in porcine model of graft stenosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(16554328):2432-8.
117. French D. The Schardinger dextrans. *Adv Carbohydr Chem*. 1957;12:189-260.
118. Szejtli J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem Rev*. 1998 Jul 30;98(5):1743-54.
119. Li Z, Wang M, Wang F, Gu Z, Du G, Wu J, et al. gamma-Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007 Nov;77(2):245-55.
120. Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J Pharm Sci*. 1996 Oct;85(10):1017-25.
121. Laza-Knoerr AL, Gref R, Couvreur P. Cyclodextrins for drug delivery. *Journal of Drug Targeting*. 2010;18(9):645-56.
122. Ritter, Helmut, Tabatabai, Monir G. Cyclodextrin in polymer synthesis: a green way to polymers. Kidlington, ROYAUME-UNI: Elsevier; 2002.
123. Gould S, Scott RC. 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-beta-CD): a toxicology review. *Food Chem Toxicol*. 2005 Oct;43(10):1451-9.
124. Uekama K, Irie T. Industrial uses of methylated cyclodextrins derivatives. In: Duchene D, editor. *Cyclodextrins and Their Industrial Uses*. Paris: Editions de santé; 1987.
125. Dubes A Fau - Degobert G, Degobert G Fau - Fessi H, Fessi H Fau - Parrot-Lopez H, Parrot-Lopez H. Synthesis and characterisation of sulfated amphiphilic alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins: application to the complexation of acyclovir. 20031013 DCOM-20040728(0008-6215 (Print)).
126. Loftsson T, Jarho P, Masson M, Jarvinen T. Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2005 Mar;2(2):335-51.
127. Loftsson T Fau - Matthiasson K, Matthiasson K Fau - Masson M, Masson M. The effects of organic salts on the cyclodextrin solubilization of drugs. 20030820 DCOM-20040203(0378-5173 (Print)).
128. Granero Ge Fau - Maitre MM, Maitre Mm Fau - Garnero C, Garnero C Fau - Longhi MR, Longhi MR. Synthesis, characterization and in vitro release studies of a new acetazolamide-HP-beta-CD-TEA inclusion complex. 20080310 DCOM-20080626(0223-5234 (Print)).
129. Matsuda H, Arima H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. 20000605(1872-8294 (Electronic)).
130. Masahiko K, Fumitoshi H, Kaneto U. Improvement of oral and rectal bioavailabilities of carmofur by methylated α -cyclodextrin complexations. *International Journal of Pharmaceutics*. [doi: 10.1016/0378-5173(87)90114-1]. 1987;38(1-3):191-8.
131. Duchene D Fau - Wouessidjewe D, Wouessidjewe D Fau - Ponchel G, Ponchel G. Cyclodextrins and carrier systems. 19991222 DCOM-19991222(0168-3659 (Print)).
132. Gref R Fau - Amiel C, Amiel C Fau - Molinard K, Molinard K Fau - Daoud-Mahammed S, Daoud-Mahammed S Fau - Seville B, Seville B Fau - Gillet B, Gillet B Fau - Beloeil J-C, et al. New self-assembled nanogels based on host-guest interactions: characterization and drug loading. 20060328 DCOM-20070724(0168-3659 (Print)).

133. Maestrelli F Fau - Garcia-Fuentes M, Garcia-Fuentes M Fau - Mura P, Mura P Fau - Alonso MJ, Alonso MJ. A new drug nanocarrier consisting of chitosan and hydroxypropylcyclodextrin. 20060531 DCOM- 20060811(0939-6411 (Print)).
134. Frank DW, Gray JE, Weaver RN. Cyclodextrin nephrosis in the rat. *Am J Pathol*. 1976 May;83(2):367-82.
135. Duchene, D, Bachot, A, Loftsson, T G. Les cyclodextrines et leurs utilisations en pharmacie et cosmétologie. Paris, FRANCE: Editions de santé; 2009. p. 13.
136. Stella Vj Fau - He Q, He Q. Cyclodextrins. 20080313 DCOM- 20080410(1533-1601 (Electronic)).
137. Irie T, Uekama K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sci*. 1997 Feb;86(2):147-62.
138. Shimpi S, Chauhan B, Shimpi P. Cyclodextrins: application in different routes of drug administration. *Acta Pharm*. 2005 Jun;55(2):139-56.
139. Blanchemain N, Haulon S, Boschini F, Marcon-Bachari E, Traisnel M, Morcellet M, et al. Vascular prostheses with controlled release of antibiotics Part 1: Surface modification with cyclodextrins of PET prostheses. *Biomol Eng*. 2007 Feb;24(1):149-53.
140. Blanchemain N, Haulon S, Boschini F, Marcon-Bachari E, Traisnel M, Morcellet M, et al. Vascular prostheses with controlled release of antibiotics Part 1: Surface modification with cyclodextrins of PET prostheses. *Biomol Eng*. 2007;24(16860600):149-53.
141. Ghoul YE, Martel B, Morcellet M, Campagne C, El Achari A, Roudesli S. Mechanical and physico-chemical characterization of cyclodextrin finished polyamide fibers *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. 2007;57:47-52.
142. Blanchemain N, Laurent T, Chai F, Neut C, Haulon S, Krump-konvalinkova V, et al. Polyester vascular prostheses coated with a cyclodextrin polymer and activated with antibiotics: cytotoxicity and microbiological evaluation. *Acta Biomater*. 2008 Nov;4(6):1725-33.
143. Blanchemain N, Laurent T, Haulon S, Traisnel M, Neut C, Kirkpatrick CJ, et al. In vitro study of a HPy-cyclodextrin grafted PET vascular prosthesis for application as anti-infectious drug delivery system. *J Incl Phen Macr Chem*. 2007;57:675-81.
144. Gupta B, Plummer C, Bisson I, Frey P, Hilborn J. Plasma-induced graft polymerization of acrylic acid onto poly(ethylene terephthalate) films: characterization and human smooth muscle cell growth on grafted films. *Biomaterials*. 2002 Feb;23(3):863-71.
145. Setacci C, de Donato G, Chisci E, Setacci F, Sirignano P, Galzerano G. Epidemiology of vascular graft infections. In: Goeau-Brissonniere O, Kieffer E, Ricco J, editors. *Vascular Surgery 2009*. Neuilly-sur-seine: Global média santé; 2009. p. 10-5.
146. Tatterton MR, Homer-Vanniasinkam S. Infections in vascular surgery. *Injury*. 2011 Dec;42 Suppl 5:S35-41.
147. Otto M. Staphylococcus epidermidis--the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Aug;7(8):555-67.
148. Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Lancet*. 2006 Mar 4;367(9512):731-9.
149. Anderson DJ, Sexton DJ, Kanafani ZA, Auten G, Kaye KS. Severe surgical site infection in community hospitals: epidemiology, key procedures, and the changing prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007 Sep;28(9):1047-53.

150. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Tech Bull Regist Med Technol*. 1966 Mar;36(3):49-52.
151. Chao J, Meng D, Li J, Xu H, Huang S. Preparation and study on the novel solid inclusion complex of ciprofloxacin with HP-beta-cyclodextrin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2004 Feb;60(3):729-34.
152. Jianbin C, Liang C, Hao X, Dongpin M. Preparation and study on the solid inclusion complex of ciprofloxacin with beta-cyclodextrin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2002 Nov;58(13):2809-15.
153. Tewes F, Brillault J, Couet W, Olivier JC. Formulation of rifampicin-cyclodextrin complexes for lung nebulization. *J Control Release*. 2008 Jul 14;129(2):93-9.
154. Mehta SK, Bhasin KK, Mehta N, Dham S. Behavior of rifampicin in association with β -cyclodextrin in aqueous media: a spectroscopic and conductometric study. *Colloid & Polymer Science*. 2005;283(5):532-8.
155. Carrier RL, Miller LA, Ahmed I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *J Control Release*. 2007 Nov 6;123(2):78-99.
156. Arima H, Hirayama F, Okamoto C, Uekama K. Recent aspects of cyclodextrin-based pharmaceutical formulations. *Recent Res Devel Chem Pharm Sciences*. 2002; 2:155-93.
157. Murphy JG, Schwartz RS, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR, Jr. Percutaneous polymeric stents in porcine coronary arteries. Initial experience with polyethylene terephthalate stents. *Circulation*. 1992 Nov;86(5):1596-604.
158. Gottenbos B, Busscher HJ, Van Der Mei HC, Nieuwenhuis P. Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. *J Mater Sci Mater Med*. 2002 Aug;13(8):717-22.
159. McLorinan GC, Glenn JV, McMullan MG, Patrick S. Propionibacterium acnes wound contamination at the time of spinal surgery. *Clin Orthop Relat Res*. 2005 Aug(437):67-73.
160. Neut D, Dijkstra RJ, Thompson JI, van der Mei HC, Busscher HJ. Antibacterial efficacy of a new gentamicin-coating for cementless prostheses compared to gentamicin-loaded bone cement. *J Orthop Res*. 2011 Nov;29(11):1654-61.
161. Werner C, Maitz MF, Sperling C. Current strategies towards hemocompatible coatings. *Journal of Materials Chemistry*. 2007;17(32):3376-84.
162. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol*. 2005 Jan;23(1):47-55.
163. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*. 2003 Nov;24(24):4385-415.
164. Vladkova TG. Surface Engineered Polymeric Biomaterials with Improved Biocontact Properties. *International Journal of Polymer Science*. 2010;2010.
165. Nuttelman CR, Mortisen DJ, Henry SM, Anseth KS. Attachment of fibronectin to poly(vinyl alcohol) hydrogels promotes NIH3T3 cell adhesion, proliferation, and migration. *J Biomed Mater Res*. 2001 Nov;57(2):217-23.
166. Tong YW, Shoichet MS. Peptide surface modification of poly(tetrafluoroethylene-co-hexafluoropropylene) enhances its interaction with central nervous system neurons. *J Biomed Mater Res*. 1998 Oct;42(1):85-95.
167. Massia SP, Hubbell JA. Human endothelial cell interactions with surface-coupled adhesion peptides on a nonadhesive glass substrate and two polymeric biomaterials. *J Biomed Mater Res*. 1991 Feb;25(2):223-42.

168. Nilsson K, Mosbach K. Immobilization of enzymes and affinity ligands to various hydroxyl group carrying supports using highly reactive sulfonyl chlorides. *Biochem Biophys Res Commun*. 1981 Sep 16;102(1):449-57.
169. Benders R, Niemeyer CM, Wohrle D. Dendrimer-activated solid supports for nucleic acid and protein microarrays. *Chembiochem*. 2001 Sep 3;2(9):686-94.
170. Dekker A, Reitsma K, Beugeling T, Bantjes A, Feijen J, van Aken WG. Adhesion of endothelial cells and adsorption of serum proteins on gas plasma-treated polytetrafluoroethylene. *Biomaterials*. 1991 Mar;12(2):130-8.
171. Li B, Chen J, Wang JH. RGD peptide-conjugated poly(dimethylsiloxane) promotes adhesion, proliferation, and collagen secretion of human fibroblasts. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Dec 15;79(4):989-98.
172. Baquey C, Palumbo F, Porte-Durrieu MC, Legeay G, Tressaud A, d'Agostino R. Plasma treatment of expanded PTFE offers a way to a biofunctionalization of its surface. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. [doi: 10.1016/S0168-583X(99)00106-8]. 1999;151(1,À4):255-62.
173. Tam JP, Yu Q, Miao Z. Orthogonal ligation strategies for peptide and protein. *Biopolymers*. 1999;51(5):311-32.
174. Camarero JA, Kwon Y, Coleman MA. Chemoselective attachment of biologically active proteins to surfaces by expressed protein ligation and its application for "protein chip" fabrication. *J Am Chem Soc*. 2004 Nov 17;126(45):14730-1.
175. Thumshirn G, Hersel U, Goodman SL, Kessler H. Multimeric cyclic RGD peptides as potential tools for tumor targeting: solid-phase peptide synthesis and chemoselective oxime ligation. *Chemistry*. 2003 Jun 16;9(12):2717-25.
176. Yoon JJ, Chung HJ, Lee HJ, Park TG. Heparin-immobilized biodegradable scaffolds for local and sustained release of angiogenic growth factor. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Dec 15;79(4):934-42.
177. Kim HK, Chung HJ, Park TG. Biodegradable polymeric microspheres with "open/closed" pores for sustained release of human growth hormone. *J Control Release*. 2006 May 15;112(2):167-74.
178. Yasuda H, Gazicki M. Biomedical applications of plasma polymerization and plasma treatment of polymer surfaces. *Biomaterials*. 1982 Apr;3(2):68-77.
179. Kim SW, Wisniewski S, Lee ES, Winn ML. Role of protein and fatty acid adsorption on platelet adhesion and aggregation at the blood-polymer interface. *J Biomed Mater Res*. 1977 Jan;11(1):23-31.
180. Poncin-Epaillard F, Legeay G. Surface engineering of biomaterials with plasma techniques. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2003;14(10):1005-28.
181. De Bartolo L, Morelli S, Piscioneri A, Lopez LC, Favia P, d'Agostino R, et al. Novel membranes and surface modification able to activate specific cellular responses. *Biomol Eng*. 2007 Feb;24(1):23-6.
182. Keranov I, Vladkova T, Minchev M, Kostadinova A, Altankov G. Preparation, characterization, and cellular interactions of collagen-immobilized PDMS surfaces. *Journal of Applied Polymer Science*. 2008;110(1):321-30.
183. Aronsson BO, Lausmaa J, Kasemo B. Glow discharge plasma treatment for surface cleaning and modification of metallic biomaterials. *J Biomed Mater Res*. 1997 Apr;35(1):49-73.
184. Kramer PW, Yeh YS, Yasuda H. Low temperature plasma for the preparation of separation membranes. *Journal of Membrane Science*. [doi: 10.1016/S0376-7388(00)81167-9]. 1989;46(1):1-28.

185. Ratner BD. Plasma deposition for biomedical applications: a brief review. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1992;4(1):3-11.
186. Ravichandran R, Sundarrajan S, Venugopal JR, Mukherjee S, Ramakrishna S. Advances in Polymeric Systems for Tissue Engineering and Biomedical Applications. *Macromolecular Bioscience.* 2012;12(3):286-311.
187. Pratt KJ, Williams SK, Jarrell BE. Enhanced adherence of human adult endothelial cells to plasma discharge modified polyethylene terephthalate. *J Biomed Mater Res.* 1989 Oct;23(10):1131-47.
188. Baier RE, Depalma VA, Furuse A, Gott VL, Kammlott GW, Lucas T, et al. Thromboresistance of glass after glow discharge treatment in argon. *J Biomed Mater Res.* 1975 Nov;9(6):547-60.
189. Joseph G, Sharma CP. Platelet adhesion to surfaces treated with glow discharge and albumin. *J Biomed Mater Res.* 1986 May-Jun;20(5):677-82.
190. Sipehia R. X-ray photoelectron spectroscopy studies, surface tension measurements, immobilization of human serum albumin, human fibrinogen and human fibronectin onto ammonia plasma treated surfaces of biomaterials useful for cardiovascular implants and artificial cornea implants. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol.* 1993;21(5):647-58.
191. Lu W-L, Huang C-Y, Roan M-L. Effect of plasma treatment on the degree of AAm grafting for high-density polyethylene. *Surface and Coatings Technology.* [doi: 10.1016/S0257-8972(03)00337-2]. 2003;172(2,À3):251-61.
192. Chandy T, Das GS, Wilson RF, Rao GH. Use of plasma glow for surface-engineering biomolecules to enhance bloodcompatibility of Dacron and PTFE vascular prosthesis. *Biomaterials.* 2000;21(10711967):699-712.
193. Brauer DS, Gentleman E, Farrar DF, Stevens MM, Hill RG. Benefits and drawbacks of zinc in glass ionomer bone cements. *Biomed Mater.* 2011 Aug;6(4):045007.
194. Sun J, Forster AM, Johnson PM, Eidelman N, Quinn G, Schumacher G, et al. Improving performance of dental resins by adding titanium dioxide nanoparticles. *Dent Mater.* 2011 Oct;27(10):972-82.
195. Scarioti GD, Lubambo A, Feitosa JP, Sierakowski MR, Bresolin TM, de Freitas RA. Nanocapsule of cationic liposomes obtained using "in situ" acrylic acid polymerization: stability, surface charge and biocompatibility. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2011 Oct 15;87(2):267-72.
196. Sarti F, Iqbal J, Muller C, Shahnaz G, Rahmat D, Bernkop-Schnurch A. Poly(acrylic acid)-cysteine for oral vitamin B12 delivery. *Anal Biochem.* 2012 Jan 1;420(1):13-9.
197. Choo ES, Yu B, Xue J. Synthesis of poly(acrylic acid) (PAA) modified Pluronic P123 copolymers for pH-stimulated release of doxorubicin. *J Colloid Interface Sci.* 2011 Jun 15;358(2):462-70.
198. Baloglu E, Ay Senyigit Z, Karavana SY, Vetter A, Metin DY, Hilmioglu Polat S, et al. In vitro evaluation of mucoadhesive vaginal tablets of antifungal drugs prepared with thiolated polymer and development of a new dissolution technique for vaginal formulations. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2011;59(8):952-8.
199. Baquey C. Biomaterials science: prospects for the new millenium? *J Mater Sci Mater Med.* 1999 Dec;10(12):695-6.
200. San Roman J, Bujan J, Bellon JM, Gallardo A, Escudero MC, Jorge E, et al. Experimental study of the antithrombogenic behavior of Dacron vascular grafts coated with hydrophilic acrylic copolymers bearing salicylic acid residues. *J Biomed Mater Res.* 1996;32(8864869):19-27.

201. Kim YJ, Kang IK, Huh MW, Yoon SC. Surface characterization and in vitro blood compatibility of poly(ethylene terephthalate) immobilized with insulin and/or heparin using plasma glow discharge. *Biomaterials*. 2000 Jan;21(2):121-30.
202. Shin Y, Son K, Yoo DI. Functional finishing by using atmospheric pressure plasma: Grafting of PET nonwoven fabric. *Journal of Applied Polymer Science*. 2007;103(6):3655-9.
203. Waldman A, Kritharides L. The pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors: their role in osteoporosis and dementia. *Drugs*. 2003;63(2):139-52.
204. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:89-118.
205. Bellosa S, Bernini F, Ferri N, Quarato P, Canavesi M, Arnaboldi L, et al. Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis*. 1998 Apr;137 Suppl:S101-9.
206. Hernandez-Presa MA, Ortego M, Tunon J, Martin-Ventura JL, Mas S, Blanco-Colio LM, et al. Simvastatin reduces NF-kappaB activity in peripheral mononuclear and in plaque cells of rabbit atheroma more markedly than lipid lowering diet. *Cardiovasc Res*. 2003 Jan;57(1):168-77.
207. Liang YJ, Shyu KG, Wang BW, Lai LP. Simvastatin inhibits C-reactive protein-induced pro-inflammatory changes in endothelial cells by decreasing mevalonate pathway products. *Cardiology*. 2008;110(3):182-90.
208. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004;109(15198963):27-32.
209. Chen H, Ren JY, Xing Y, Zhang WL, Liu X, Wu P, et al. Short-term withdrawal of simvastatin induces endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease: a dose-response effect dependent on endothelial nitric oxide synthase. *Int J Cardiol*. 2009 Jan 24;131(3):313-20.
210. Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, et al. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest*. 1994 Nov;94(5):2036-44.
211. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1989;83(2540223):1774-7.
212. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*. 1987;2(2889967):1057-8.
213. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(1675786):4651-5.
214. Chan AW, Bhatt DL, Chew DP, Reginelli J, Schneider JP, Topol EJ, et al. Relation of inflammation and benefit of statins after percutaneous coronary interventions. *Circulation*. 2003;107(12665489):1750-6.
215. Jaschke B, Michaelis C, Milz S, Vogeser M, Mund T, Hengst L, et al. Local statin therapy differentially interferes with smooth muscle and endothelial cell proliferation and reduces neointima on a drug-eluting stent platform. *Cardiovasc Res*. 2005;68(16111664):483-92.
216. Herbert JM, Herault JP, Bernat A, van Amsterdam RG, Lormeau JC, Petitou M, et al. Biochemical and pharmacological properties of SANORG 34006, a potent and long-acting synthetic pentasaccharide. *Blood*. 1998 Jun 1;91(11):4197-205.
217. Petitou M, van Boeckel CA. A synthetic antithrombin III binding pentasaccharide is now a drug! What comes next? *Angew Chem Int Ed Engl*. 2004 Jun 14;43(24):3118-33.

218. Prandoni P, Tormene D, Perlati M, Brandolin B, Spiezia L. Idraparinux: review of its clinical efficacy and safety for prevention and treatment of thromboembolic disorders. *Expert Opin Investig Drugs*. 2008 May;17(5):773-7.
219. Harenberg J. Development of idraparinux and idrabiotaparinux for anticoagulant therapy. *Thromb Haemost*. 2009 Nov;102(5):811-5.
220. Patrono C, Baigent C, Hirsh J, Roth G. Antiplatelet drugs: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*. 2008 Jun;133(6 Suppl):199S-233S.
221. Hechler B, Freund M, Alame G, Leguay C, Gaertner S, Cazenave JP, et al. The antithrombotic activity of EP224283, a neutralizable dual factor Xa inhibitor/glycoprotein IIb/IIIa antagonist, exceeds that of the coadministered parent compounds. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011 Aug;338(2):412-20.
222. Gref R, Couvreur P, Barratt G, Mysiakine E. Surface-engineered nanoparticles for multiple ligand coupling. *Biomaterials*. [doi: 10.1016/S0142-9612(03)00348-X]. 2003;24(24):4529-37.
223. Loughrey HC, Choi LS, Cullis PR, Bally MB. Optimized procedures for the coupling of proteins to liposomes. *Journal of Immunological Methods*. [doi: 10.1016/0022-1759(90)90394-B]. 1990;132(1):25-35.
224. Black FE, Hartshorne M, Davies MC, Roberts CJ, Tendler SJB, Williams PM, et al. Surface Engineering and Surface Analysis of a Biodegradable Polymer with Biotinylated End Groups. *Langmuir*. [doi: 10.1021/la9803575]. 1999 1999/04/01;15(9):3157-61.
225. Livnah O, Bayer EA, Wilchek M, Sussman JL. Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jun 1;90(11):5076-80.
226. Krump-Konvalinkova V, Bittinger F, Unger RE, Peters K, Lehr HA, Kirkpatrick CJ. Generation of human pulmonary microvascular endothelial cell lines. *Lab Invest*. 2001 Dec;81(12):1717-27.
227. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000 Sep;267(17):5421-6.
228. Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol In Vitro*. 2004 Oct;18(5):703-10.
229. Tamada Y, Kulik EA, Ikada Y. Simple method for platelet counting. *Biomaterials*. 1995 Feb;16(3):259-61.
230. Fasl H, Stana J, Stropnik D, Strnad S, Stana-Kleinschek K, Ribitsch V. Improvement of the hemocompatibility of PET surfaces using different sulphated polysaccharides as coating materials. *Biomacromolecules*. 2010 Feb 8;11(2):377-81.
231. Greisler HP, Gosselin C, Ren D, Kang SS, Kim DU. Biointeractive polymers and tissue engineered blood vessels. *Biomaterials*. 1996;17(8745330):329-36.
232. Gimbrone MA, Jr. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol*. 1999 Jul;155(1):1-5.
233. Ray KK, Cannon CP. Intensive statin therapy in acute coronary syndromes: clinical benefits and vascular biology. *Curr Opin Lipidol*. 2004;15(15529022):637-43.
234. Kuijk LM, Mandey SH, Schellens I, Waterham HR, Rijkers GT, Coffey PJ, et al. Statin synergizes with LPS to induce IL-1 β release by THP-1 cells through activation of caspase-1. *Mol Immunol*. 2008;45(18242710):2158-65.
235. Laufs U, Liao JK. Targeting Rho in cardiovascular disease. *Circ Res*. 2000;87(11009552):526-8.

236. Dichtl W, Dulak J, Frick M, Alber HF, Schwarzacher SP, Ares MPS, et al. HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(12524225):58-63.
237. Parmar KM, Nambudiri V, Dai G, Larman HB, Gimbrone MA, Garcia-Cardena G. Statins exert endothelial atheroprotective effects via the KLF2 transcription factor. *J Biol Chem*. 2005;280(15878865):26714-9.
238. Tuomisto TT, Lumivuori H, Kansanen E, Hakkinen S-K, Turunen MP, van Thienen JV, et al. Simvastatin has an anti-inflammatory effect on macrophages via upregulation of an atheroprotective transcription factor, Kruppel-like factor 2. *Cardiovasc Res*. 2008;78(18192240):175-84.

RÉSUMÉ

Amélioration des propriétés antibactériennes et anticoagulantes des prothèses vasculaires en polyester par immobilisation et libération contrôlée de principes actifs

Les prothèses et les endoprothèses vasculaires, une fois implantées dans le corps humain, sont sujettes à un certain nombre de complications. Les infections, les thromboses précoces et les occlusions tardives sont les plus fréquentes, générant des conséquences cliniques très souvent délétères et parfois létales. Les difficultés de prise en charge de ces complications sont à l'origine des efforts déployés dans la recherche de solutions visant à améliorer les matériaux prothétiques. Aucune avancée clinique majeure n'a jusque-là été notée. Des études réalisées antérieurement dans notre laboratoire ont permis de développer des prothèses vasculaires en polyester dotées d'un revêtement de polymère d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine capable d'adsorber puis de libérer de manière prolongée divers antibiotiques. Au cours des présents travaux nous avons déterminé les conditions optimales pour une libération effective de trois antibiotiques à partir de ces prothèses revêtues d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine. Nous en avons testé l'efficacité dans des modèles *in vitro* et *in vivo* d'infections vasculaires. Nous avons eu recours à neuf souches pathogènes parmi les plus fréquemment rencontrées dans ce contexte en pathologie humaine. Nous avons parallèlement évalué *in vivo* l'innocuité, la tolérance tissulaire et la biocompatibilité de ces prothèses dans la perspective d'une application clinique.

Le système développé s'est avéré efficace en libérant *in situ* sur une huitaine de jours les molécules antibactériennes sélectionnées. Les concentrations requises des solutions ainsi que le temps nécessaire d'imprégnation des prothèses étaient compatibles avec la pratique chirurgicale. Une activité bactéricide par réduction significative de l'adhésion, de la croissance et de la prolifération bactérienne a été observée comparativement aux témoins dans les différents modèles d'infections testés. Nos résultats démontrent aussi la possibilité d'utiliser ces molécules seules ou en association sans qu'il y ait d'antagonisme. Il deviendra ainsi possible de moduler et d'adapter le traitement antibiotique local, délivré *in situ*, en ciblant les divers pathogènes rencontrés dans le cadre d'infections mono ou polymicrobiennes. Les prothèses revêtues d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine ont démontré *in vivo* une bonne intégration tissulaire et une excellente tolérance locale sans signe de toxicité systémique.

Par ailleurs, le concept du revêtement des prothèses vasculaires par un polymère d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine souffre de limitations théoriques potentielles quand il faut s'attaquer à la thrombogénicité immédiate ou tardive de ces prothèses. L'efficacité limitée dans le temps et l'inadéquation de certains principes actifs d'intérêt à former des complexes d'inclusion avec les cyclodextrines constituent à ce compte les principaux écueils. Nous avons de ce fait développé un système alternatif d'immobilisation de principes actifs sur des prothèses vasculaires en polyester dans le but de réduire leur thrombogénicité. Notre stratégie a consisté à soumettre la prothèse à un traitement par plasma froid suivi d'un greffage de l'acide acrylique par copolymérisation. Les fonctions carboxyliques ainsi ajoutées ont ensuite permis la fixation directe ou via un agent espaceur d'une molécule bioactive d'intérêt comme la simvastatine, l'héparine ou un agent inhibiteur du facteur Xa couplé d'un antagoniste de la glycoprotéine IIb/IIIa. L'étude extensive des paramètres réactionnels nous a permis de déterminer les conditions optimales de traitement par plasma froid, de la polymérisation

greffante par l'acide acrylique et de la fixation des différents principes actifs. Les tests biologiques de coagulation sanguine, d'adhésion plaquettaire, d'agrégation plaquettaire, d'hémolyse et de prolifération de cellules endothéliales et musculaires lisses, ont été réalisés sur les prothèses vasculaires ainsi modifiées et sur des prothèses témoins appropriées. Nos résultats démontrent une activité biologique de ces prothèses avec une diminution de l'adhésion plaquettaire, un ralentissement de la cinétique d'agrégation plaquettaire, et une élongation du temps de céphaline activée.

Improvement of antibacterial and anticoagulant properties of polyester vascular prostheses by immobilization and controlled release of biologically active compounds

Synthetic vascular prosthesis likewise vascular endoprosthesis are prone to several complications after implantation into the human body. Infections, thromboses and late occlusions are the most challenging and the most common, leading to serious clinical consequences that are sometimes lethal. Management of those complications is still fraught with tremendous difficulties justifying the economic burden and the continuous efforts in research development for improving vascular prosthetic materials. This research investment is, however, yet to yield any great clinical advance. Previous studies conducted in our research laboratory have led to the development of polyester vascular prostheses coated with a polymer of hydroxypropyl- β -cyclodextrin. This was achieved in order to increase the loading and eluting capacities of these vascular prostheses towards several antibiotics. In the current works, we sought to determine the optimal conditions for effective controlled release of three antibiotics from those prosthetic platforms. We have also evaluated their efficacy in both *in vitro* and *in vivo* models of vascular infections. This was carried-out against nine different bacteria strains that are among the most common in human vascular infections. Moreover, we have assessed *in vivo* their safety, their healing properties, their systemic toxicity and their biocompatibility in the prospect of clinical application.

The above-mentioned drug delivery system has been proved to be effective in releasing *in situ* the selected antibacterial agents over a seven-day desorption period in human plasma. Optimal batch concentration and time for prosthetic immersion into the antibiotic solutions were well compatible with current surgical practice standards. A bactericidal activity evidenced by significant reduction of bacterial adhesion, growth and proliferation was revealed when compared to appropriate controls in the various tested vascular infection models. We have also studied antibacterial molecules alone or in combination. In this latter setting, no antagonistic effects were depicted. This provides a unique opportunity to customize local antibiotic treatment delivered *in situ* from vascular device fabrics and to adapt it to the evolving ecology of both monomicrobial and polymicrobial vascular prosthetic infections. The polyester vascular prostheses coated with a polymer of hydroxypropyl- β -cyclodextrin were proved *in vivo* safe and demonstrated excellent biocompatibility, healing properties and tissue integration without any signs of systemic toxicity.

The concept of prostheses coated with a polymer of hydroxypropyl- β -cyclodextrin faces however several potential theoretical limitations when addressing the issues of immediate or late thrombogenicity of vascular prostheses. Time-limited effectiveness and failure of some active compounds of interest to form inclusion complexes with the hydroxypropyl- β -cyclodextrin mainly account for those restraints. We have thus developed an alternative system aiming to immobilize biologically active compounds onto the surface of polyester vascular prostheses in order to decrease their thrombogenicity. The surfaces were first pre-activated by cold-plasma treatment. Acrylic acid was subsequently grafted onto these pre-

activated substrates by an in situ free radical copolymerization process. The incorporated carboxylic groups were then used to fix directly or via a spacer a bioactive molecule such as simvastatin, heparin or an inhibitor of the Xa factor coupled with a glycoprotein IIb/IIIa antagonist. Comprehensive physicochemical characterization enabled us to determine the optimum conditions for cold plasma treatment, for acrylic acid free radical copolymerization grafting process and for the bioactive molecules surface immobilization. Biological tests, comprising blood coagulation, platelet adhesion, platelet aggregation, hemolysis, endothelial and smooth muscle cells proliferation assays, were carried-out on the modified vascular prostheses and suitable controls. The results have demonstrated that these modified prostheses can reduce platelet adhesion, decelerate platelet aggregation kinetics and elongate the partial thromboplastin time.